

---

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

## RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LA DÉFENSE DE L'ORGANISME CONTRE L'INFECTION TUBERCULEUSE (SÉROTHÉRAPIE - IMMUNITÉ)

par A. CALMETTE et C. GUÉRIN

(Institut Pasteur de Lille).

A la suite d'expériences relatées dans les *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* (1) et qui avaient pour objet l'étude des modifications subies par le bacille tuberculeux *de culture* dans son passage à travers le tube digestif, nous avons été conduits à étudier l'influence des cultures successives de ce bacille sur pomme de terre cuite dans la bile de bœuf glycérinée à 5 p. 100 et nous avons constaté que, déjà après un seul passage sur un tel milieu, la virulence est plus grande pour le cobaye que celle d'une culture faite parallèlement en partant de la même semence sur pomme de terre glycérinée suivant la technique usuelle.

Par contre, si l'on multiplie les cultures par réensemencements successifs sur bile de bœuf, la virulence pour le cobaye, au lieu de s'accroître, s'atténue à chaque passage. Au *quinzième passage*, l'inoculation intrapéritonéale de 1 milligramme de bacilles de culture biliée (pesés à l'état frais) détermine une tuberculose viscérale compatible pendant plus de cinq mois

(1) 28 décembre 1908, 2 novembre 1909.

avec les apparences d'une bonne santé sans amaigrissement. La même inoculation faite sous la peau de la cuisse provoque tardivement (du quarantième au cinquantième jour) un gonflement du ganglion inguinal correspondant ; parfois un abcès se forme au point d'inoculation, puis cet abcès se vide, se cicatrice et le ganglion reste gros comme un petit pois, gardant sa mobilité. L'affection n'a aucune tendance à la généralisation. Les animaux continuent à rester bien portants. Au *quarante-deuxième passage*, le bacille bilié a conservé ces mêmes caractères. Sa virulence semble s'être immobilisée. L'inoculation de 1 milligramme de bacilles sous la peau de la cuisse du cobaye produit toujours l'engorgement et l'induration du ganglion inguinal, parfois une lésion superficielle qui guérit, sans que jamais l'infection se généralise.

Par contre, ce bacille du *quarante-deuxième passage* se montre d'une extrême virulence pour le cheval.

**EXPÉRIENCE.** — Deux chevaux vigoureux âgés de 3 ans et 14 ans, qui ont reçu chacun dans la veine jugulaire 5 milligr. de bacilles biliés du quarante-deuxième passage, ont succombé respectivement les 55<sup>e</sup> et 73<sup>e</sup> jours avec des lésions énormes de granulie généralisée.

Pour les bovidés, le bacille cultivé sur bile a suivi la même marche de virulence décroissante que nous avons observée pour les cobayes. Quelle que soit la dose injectée dans la jugulaire, jusqu'à 100 milligrammes, on détermine une maladie générale d'allure typhique, dont l'issue est rarement fatale, et au cours de laquelle, même dans les cas mortels, on ne constate la formation de lésions folliculaires dans aucun organe.

Nos expériences d'hypervaccination des bovidés vis-à-vis de ces bacilles biliés, commencées en avril 1908, et dont une partie a été relatée dans notre note du 2 novembre 1909, se poursuivent encore actuellement. Quatorze génisses de trois ans ont été ainsi entraînées à recevoir des émulsions bacillaires dans les veines jusqu'à la dose de 200 milligrammes répétée chaque mois (bacilles pesés à l'état frais). Après sept mois de ce régime, neuf de ces animaux se sont cachectisés, sans que la cessation des inoculations ait amené d'amélioration. Ces

génisses ont succombé ou ont été abattues *in extremis*. A l'autopsie de ces animaux, faite pour deux d'entre eux en présence de M. Roux, en juillet 1910, l'examen le plus minutieux ne permit pas de déceler la moindre trace de lésions tuberculeuses.

L'inoculation des ganglions bronchiques, médiastinaux et mésentériques, au cobaye, montra cependant que ces organes contenaient des bacilles dont la virulence pour les cobayes était plus grande que celle des bacilles provenant des cultures qui avaient servi aux inoculations ; car ces cobayes, tous porteurs de l'adénite spécifique, présentaient à l'autopsie, faite après soixante-quinze jours, des ganglions sous-lombaires caséux et, pour quelques-uns, des lésions discrètes du foie, de la rate et des poumons.

Les cinq génisses survivantes se maintinrent dans un état satisfaisant, mais nous ne leur injectâmes plus chaque mois que 25 milligrammes de bacilles biliés dans les veines. Elles ont reçu au total, depuis le début de leur immunisation jusqu'au 1<sup>er</sup> août 1911, 2 gr. 605 de bacilles dans la jugulaire.

Elles ont été saignées régulièrement — la saignée étant d'environ 2 litres — le dixième jour après chaque injection vaccinale. Ce délai de dix jours fut choisi parce qu'il correspond au moment où le sérum présente son plus haut pouvoir agglutinant.

## I

### PROPRIÉTÉS DU SÉRUM DES BOVINS IMMUNISÉS CONTRE LE BACILLE CULTIVÉ SUR BILE DE BŒUF.

Le sérum des animaux ainsi préparés, après avoir agglutiné le bacille bilié au 1/10.000 pendant plusieurs mois, ne l'agglutine plus qu'au taux de 1/6.000 en deux heures, à la température de 37 degrés. De même, après avoir fourni d'abondants précipités avec les solutions de tuberculine et aussi avec les solutions de malléine, il n'en produit plus avec cette dernière substance. La précipitation en présence de tuberculine, tout

en restant très nette, est peu à peu devenue moins intense et exige une plus grande quantité de sérum (1).

*A. Effets du sérum sur l'infection tuberculeuse du cobaye.* — Injecté préventivement à des séries de cobayes en une ou deux injections de 1 centimètre cube à cinq jours d'intervalle, ce sérum n'a pas modifié la réceptivité de ces animaux vis-à-vis de notre bacille virulent d'épreuve (origine bovine) inoculé aux doses de 1/50.000 de milligramme.

La même expérience, renouvelée sur des cobayes déjà tuberculeux, n'a pas permis d'observer chez ces derniers, par rapport aux témoins, de ralentissement appréciable dans l'évolution de la maladie.

Si, au contraire, on fait agir *in vitro* le sérum sur les bacilles, l'action de ces mélanges bacilles + sérum présente un grand intérêt. Nous supposons tout d'abord que nos sérum provenant d'animaux hyperimmunisés, mis en contact pendant quarante-huit heures avec des bacilles tuberculeux atténués ou virulents, modifieraient peut-être les bacilles au point de faciliter leur résorption. L'expérience montre qu'il en va tout autrement. De tels mélanges, injectés sous la peau des cobayes, entraînent des désordres locaux et généraux incomparablement plus étendus et plus rapides que ceux observés chez les cobayes témoins qui ont reçu les mêmes bacilles *sans sérum*. Des quantités minimes de bacilles virulents (1/10.000 de milligramme) mélangées à un centimètre cube de sérum et laissées en contact pendant quarante-huit heures déterminent, par l'inoculation sous-cutanée, des lésions typiques déjà apparentes au bout de huit jours, alors qu'avec la même quantité de bacilles seuls le début de la lésion locale n'apparaît que vers le vingt-cinquième ou trentième jour.

Les constatations sont presque identiques, si l'on sépare par centrifugation le sérum et les bacilles mis en contact : l'inoculation de ces derniers produit des désordres beaucoup plus graves.

(1) Rappelons d'ailleurs que, comme l'un de nous l'a montré avec L. Massol (*Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 25 juillet 1910), le précipité formé dans les mélanges sérum + tuberculine n'est pas constitué par de la tuberculine en nature ni par de la tuberculine sensibilisée ou neutralisée, car la totalité de la tuberculine mise en œuvre reste intacte dans le liquide surnageant après séparation du précipité par centrifugation.

Il ne saurait s'agir cependant d'une toxicité particulière du sérum, car ce dernier, chauffé une demi-heure à 58 degrés, est inoffensif même à haute dose, non seulement pour les cobayes sains, mais aussi pour les cobayes tuberculeux.

Des quantités extrêmement faibles de bacilles tuberculeux virulents (un millionième de milligramme), mélangées à 1 centimètre cube de sérum de bovidé hyperimmun, suffisent à tuberculer par voie sous-cutanée les cobayes dans un délai maximum de deux semaines, alors que ces mêmes doses inoculées seules exigent un délai de trois à quatre mois avant de manifester localement leur présence.

Si l'on prolonge le temps de contact du sérum avec les bacilles, la virulence n'est nullement modifiée et les mélanges effectués jusqu'à quinze jours avant l'inoculation se montrent doués des mêmes propriétés nocives.

Nous résumons ci-après l'une de nos séries d'expériences :

**EXPÉRIENCE.** — Quatre-vingts cobayes sont divisés en deux séries : 40 reçoivent sous la peau de la cuisse droite, à 30 jours d'intervalle, 1/100.000 et 1/20.000 de milligramme de bacilles biliés du 33<sup>e</sup> passage, mélangés à 1 centimètre cube de sérum de bovidé hyperimmunisé, après 48 heures de contact. Les 40 autres reçoivent sous la peau de la cuisse droite, à 30 jours d'intervalle, ces mêmes doses de 1/100.000 et de 1/20.000 de milligramme de bacilles biliés du 33<sup>e</sup> passage, mais sans sérum.

Trente jours après la seconde inoculation, tous les cobayes sont éprouvés par l'inoculation sous la peau de la cuisse gauche de 1/50.000 de milligramme de bacilles bovins virulents (souche lait, de Nocard) en même temps que 12 cobayes témoins neufs. De ces témoins, 2 sont morts les 6<sup>e</sup> et 13<sup>e</sup> jour après l'inoculation, l'un sans cause apparente, l'autre de péritonite après avortement. Les 10 autres sont morts de tuberculose généralisée, du 59<sup>e</sup> au 113<sup>e</sup> jour après l'épreuve.

Des 40 cobayes de la première série, 2 sont morts entre la première inoculation du mélange bacilles biliés + sérum et la seconde : deux autres ont succombé sans cause apparente entre la seconde inoculation et l'épreuve. 36 ont subi l'inoculation d'épreuve. De ce nombre, deux sont morts les 31<sup>e</sup> et 64<sup>e</sup> jours après l'épreuve : à l'autopsie, on trouva un tout petit point caséux dans un ganglion inguinal du côté gauche ; les organes étaient indemnes de tuberculose. 120 jours après l'inoculation d'épreuve les 34 cobayes restants sont encore vivants, leur état de santé est excellent.

Les lésions locales observées, dont le nombre et la situation sont indiqués dans le tableau ci-dessous, sont restées fermées :

<b>Adénite</b> , à droite seulement	3
— à la fois à droite et à gauche	49
— à gauche seulement	9
<b>Aucune lésion</b> , ni à droite ni à gauche	3
Total	34

Des 40 cobayes de la seconde série, 4 sont morts de causes inconnues entre la première inoculation de bacilles biliés seuls et la seconde. 36 ont donc été éprouvés. Sur ce nombre, deux sont morts les 42<sup>e</sup> et 44<sup>e</sup> jours après l'épreuve; à l'autopsie, le premier avait une énorme lésion nécrotique de la mamelle gauche et une tuberculose généralisée à tous les organes. Le second était cachectique avec un gros ganglion inguinal gauche caséux. 120 jours après l'inoculation d'épreuve, les 34 cobayes restants sont encore vivants et leur état de santé est excellent. Les lésions locales observées, dont le nombre et la situation sont indiqués dans le tableau ci-dessous, sont restées fermées :

<b>Adénite</b> , à droite seulement . . . . .	6
—    à la fois à droite et à gauche . . . . .	18
—    à gauche seulement. . . . .	9
<b>Aucune lésion</b> , ni à droite ni à gauche . . . . .	1
Total. . . . .	34

Tous ces animaux furent sacrifiés le 121<sup>e</sup> jour après l'épreuve. Deux de la première série et trois de la seconde étaient indemnes de toute lésion tuberculeuse. Tous les autres sans exception, en outre de leurs lésions locales correspondant à l'engorgement et à la caséification centrale des ganglions inguinaux, sont trouvés porteurs de lésions de la rate et des poumons à des degrés variables, mais compatibles avec un bon état de santé apparent. Il n'est pas possible d'établir de différence de gravité des lésions présentées par les cobayes de l'une ou de l'autre série.

Il est incontestable que ces cobayes ont bien résisté à l'inoculation d'épreuve qui a tué les témoins du cinquante-neuvième au cent treizième jour, mais nous pensons qu'il ne faut voir là qu'une simple résistance des cobayes déjà infectés par les inoculations de bacilles biliés à une réinfection plus intense, phénomène bien connu depuis les travaux de Koch.

En résumé, nos expériences prouvent que, chez le cobaye, le sérum de bovidé hyperimmun n'exerce aucune action préventive ou curative, et qu'au lieu de déterminer, comme on pouvait l'espérer, la résorption des bacilles tuberculeux, il aggrave au contraire l'étendue et la rapidité d'évolution des lésions produites par ces derniers.

**B. Effets du sérum hyperimmun sur l'infection tuberculeuse des bovidés.** — Il importait de rechercher si, chez les bovidés, le sérum de bovidé hyperimmun n'exerçait pas une action plus favorable. Nous allons voir que les résultats de nos expériences, bien que sensiblement différents de ceux obtenus chez les cobayes, nous conduisent à des faits de même ordre :

Exp. I. — Génisse *témoin* de race bretonne, âgée de sept mois, indemne de tuberculose, reçoit dans les veines 3 milligrammes de bacilles bovins virulents (souche lait, de Nocard). Dès le quatorzième jour, la température s'élève, l'animal maigrit, touss fréquemment. Mort le 37<sup>e</sup> jour après l'inoculation. A l'autopsie, granulie massive limitée aux poumons et aux ganglions annexes. Les organes et ganglions de la cavité abdominale paraissent sains.

Exp. II. — Génisse bretonne, âgée de sept mois, reçoit préventivement 100 centimètres cubes de sérum dans les veines. Douze jours après, on l'éprouve par 3 milligrammes de bacilles bovins virulents (souche Nocard) injectés dans les veines. Puis tous les sept jours, l'animal reçoit dans la jugulaire 20 centimètres cubes de sérum. La génisse n'a manifesté aucun trouble dans son état de santé, jusqu'au soixantième jour où elle est abattue.

A l'autopsie, on trouve dans le lobe antérieur du poumon droit un tubercule gros comme la tête d'une épingle avec centre caséux. Ce tubercule enlevé sur la pointe d'un bistouri et écrasé entre deux lames, montre au microscope de nombreux bacilles. Les ganglions bronchiques sont sains. Dans un ganglion du médiastin existe un petit follicule caséux contenant des bacilles. Enfin, dans un ganglion mésentérique on trouve deux autres petits follicules.

Les ganglions bronchiques, ceux du foie, de la rate et un du mésentère sont triturés séparément et inoculés sous la peau de 16 cobayes. 45 jours après, tous les cobayes sans exception sont porteurs de l'adénite spécifique.

Exp. III. — Génisse bretonne, âgée de sept mois, reçoit dans la jugulaire 3 milligrammes de bacilles bovins (souche Nocard) mélangés à 20 centimètres cubes de sérum après quarante-huit heures de contact. L'animal fait quelques élévations de température à partir du 10<sup>e</sup> jour après l'inoculation. Son état général est peu satisfaisant; l'appétit est très diminué. La génisse est abattue le soixantième jour, en médiocre état d'embonpoint.

A l'autopsie, tous les ganglions de la chaîne mésentérique paraissent augmentés de volume; incisés, ils sont *tous* trouvés porteurs de lésions tuberculeuses étendues, caséuses. Aucun ganglion de la chaîne n'a échappé à l'infection. Les ganglions du foie, de la rate, des réservoirs gastriques présentent tous les mêmes lésions caséuses.

La rate, doublée de volume, montre sur la coupe un nombre considérable de fins tubercules non encore caséux, et ne contenant qu'un petit nombre de bacilles.

Les deux poumons sont farcis d'un nombre incalculable de tubercules, les uns gros comme un grain de millet, d'autres comme un grain de chênevis, le plus grand nombre comme la tête d'une épingle. Les plus petits sont presque tous translucides, les autres caséux au centre.

Les ganglions bronchiques, médiastinaux, trachéaux, ainsi que ceux de l'entrée de la poitrine, quadruplés de volume, montrent sur la coupe une infinité de follicules tuberculeux caséux ou en voie de caséification.

Il résulte de ces expériences que le sérum des bovidés fortement hyperimmunisés contre le bacille bovin bilié, ne possède aucun pouvoir immunisant ou bactéricide.

Injecté préventivement et à grosse dose (260 centimètres

cubes) aux bovidés, il paraît seulement *retarder* l'évolution de l'infection d'épreuve, et favoriser la dissémination rapide des bacilles dans l'organisme.

Le mélange bacilles virulents + sérum a provoqué, avec une intensité vraiment impressionnante, cette *dissémination* des bacilles dans tous les organes et ganglions et a manifestement *aggravé* les lésions produites.

Nous croyons devoir insister sur ce fait de la *mobilisation* des bacilles par le sérum. Cette mobilisation, observée avec des mélanges *bacilles virulents + sérum*, se montre rapidement funeste. Mais il n'en est plus de même s'il s'agit de mélanges *bacilles atténués + sérum*. Dans ce cas, nous verrons par les expériences suivantes que, du moins pour ce qui concerne les bovidés, la dissémination des bacilles injectés est une condition favorable à leur disparition de l'organisme.

**Exp. I.** — *Sept génisses* (N°s 60, 61, 62, 63, 64, 65 et 66) de race bretonne, âgées de sept mois, reçoivent *dans les veines*, à 30 jours d'intervalle, 1 milligramme et 5 milligrammes de bacilles biliés des trente-troisième et trente-quatrième passages, mélangés à 8 centimètres cubes de sérum de bovidé hyperimmun après quarante-huit heures de contact. Trente jours après, le 1<sup>er</sup> mars 1911, elles sont éprouvées par injection intraveineuse de 3 milligrammes de tubercule virulente (souche lait, de Nocard). Aucun de ces animaux ne présente le moindre malaise apparent. La réaction fébrile produite chez eux par l'inoculation virulente est à peine marquée et ne dure que vingt-quatre heures, après quoi la température reste normale.

La génisse n° 60 est abattue trente jours après l'épreuve. Mais les ganglions bronchiques sont triturés en totalité et le produit de la trituration, injecté sous la peau de la cuisse de 12 cobayes, se montre infectant.

La génisse n° 61 est abattue soixante jours après l'épreuve, le 1<sup>er</sup> mai 1911. Elle ne présente aucune trace de lésion tuberculeuse, mais ses ganglions bronchiques, inoculés comme il a été dit ci-dessus à 12 cobayes, sont infectants.

Même résultat pour la génisse n° 62 abattue le 31 mai 1911, quatre-vingt-dix jours après l'épreuve.

La génisse n° 63 est abattue le 30 juin 1911, cent vingt jours après l'épreuve. Le produit de trituration de ses ganglions bronchiques, inoculé sous la peau de 12 cobayes, détermine l'infection chez deux d'entre eux seulement (ganglion inguinal au 45<sup>e</sup> jour). Les 10 autres restent indemnes.

Les génisses n°s 64, 65 et 66 sont conservées pour d'autres expériences.

**Exp. II.** — *Génisse* n° 67, de même âge et de même race que les précédentes, reçoit aux mêmes doses les mêmes mélanges de bacilles biliés + sérum *dans le tissu conjonctif sous-cutané* de l'encolure. Aucune réaction locale après les deux injections. Elle est éprouvée trente jours après, le 1<sup>er</sup> mars 1911, par inoculation *intraveineuse* de 3 milligrammes de tubercule virulente. La température le jour suivant n'a pas dépassé 39°2. Elle est restée normale dans la suite.

Abattue 120 jours après l'épreuve, le 30 juin 1911, elle ne présente aucune trace de lésion tuberculeuse. Ses ganglions bronchiques sont triturés en totalité et le produit de la trituration est inoculé sous la peau de la cuisse de 12 cobayes.

Tous ces cobayes présentent au 45<sup>e</sup> jour l'adénite spécifique.

EXP. III. — *Génisses* n°s 68, 69 et 70, de même âge et de même race que les précédentes, reçoivent aux mêmes doses *dans les veines* à trente jours d'intervalle deux inoculations de 1 et 5 milligrammes de bacilles biliés *sans sérum*. Trente jours après, le 1<sup>er</sup> mars 1911, elles sont éprouvées par inoculation intraveineuse de 3 milligrammes de tuberculose virulente. La température de la génisse 68, qui jusqu'alors était restée normale, s'élève le jour suivant jusqu'à 40°6 et oscille pendant quatre jours ensuite entre 39 et 40°3 ; puis tout rentre dans l'ordre.

Les n°s 69 et 70, restés en parfaite santé, sont conservés pour des expériences ultérieures. L'inoculation d'épreuve a déterminé, chez toutes deux, une ascension de température qui a duré trois jours pour le n° 69 et vingt-quatre heures seulement pour le n° 70.

Le n° 68 est abattu cent vingt jours après l'épreuve, le 30 juin 1911. Aucune trace de lésion tuberculeuse à l'autopsie. Les ganglions bronchiques, triturés comme il a été dit ci-dessus, sont inoculés à 12 cobayes.

Tous ces cobayes présentent au 45<sup>e</sup> jour l'adénite spécifique.

EXP. IV. — Génisse n° 71, du même lot que les précédentes, reçoit aux mêmes doses, à trente jours d'intervalle, deux inoculations *sous-cutanées* de bacilles biliés sans sérum dans le tissu conjonctif de l'encolure. Aucune réaction locale après l'injection. Elle est éprouvée trente jours après, le 1<sup>er</sup> mars 1911, par 3 milligrammes de tuberculose virulente *dans les veines*. Après l'injection, la température ne s'élève pas au delà de 39°3 et redevient normale le surlendemain.

Abattue cent vingt jours après l'épreuve, le 1<sup>er</sup> juillet 1911, elle ne présente aucune trace de lésion tuberculeuse. Ses ganglions bronchiques, triturés en totalité, sont inoculés sous la peau de 12 cobayes.

Tous ces cobayes présentent au 45<sup>e</sup> jour l'adénite spécifique.

EXP. V. — Génisse n° 72, du même lot que les précédentes, reçoit *sous la peau de l'encolure* 5 milligrammes de bacilles biliés mélangés à 100 centimètres cubes de sérum après quarante-huit heures de contact, puis, *immédiatement après*, elle est éprouvée par 3 milligrammes de tuberculose virulente dans les veines. Trente jours après, le 1<sup>er</sup> mars 1911 elle reçoit encore, de l'autre côté de l'encolure et sous la peau, 5 milligrammes de bacilles biliés mélangés à 100 centimètres cubes de sérum après 48 heures de contact.

Abattue le 30 juin 1911, 120 jours après la première inoculation. On trouve dans les ganglions bronchiques et médiastinaux de nombreux follicules tuberculeux caséux, riches en bacilles. Les poumons et les autres viscères sont indemnes.

EXP. VI. — Génisse n° 73 du même lot, sert de *témoin* aux expériences précédentes et reçoit seulement, le 1<sup>er</sup> mars 1911, 3 milligrammes de tuberculose virulente dans les veines, le même jour que les 13 autres génisses. A partir du 14<sup>e</sup> jour après l'injection la température s'élève et oscille entre 40 degrés et 40°6 jusqu'à la mort, qui a lieu le 41<sup>e</sup> jour après l'épreuve (11 avril 1911), avec des lésions de tuberculose miliaire aiguë étendues à la

*totalité des deux poumons et aux ganglions annexes qui, décuplés de volume, se trouvaient farcis de follicules tuberculeux caséux.*

Il ressort nettement de ces expériences :

1<sup>o</sup> Que, conformément aux résultats que nous avons obtenus antérieurement (1), l'élimination des bacilles d'épreuve se fait rapidement chez les animaux préparés au préalable par des inoculations de bacilles biliés mélangés à du sérum d'animal hyperimmun ;

2<sup>o</sup> Que l'élimination des bacilles d'épreuve s'effectue plus facilement lorsque ces mélanges bacilles biliés + sérum ont été inoculés dans les veines, que lorsque l'inoculation de ces mêmes mélanges a été faite par voie sous-cutanée.

## II

### ÉLIMINATION DES BACILLES TUBERCULEUX PAR L'INTESTIN CHEZ LES ANIMAUX VACCINÉS.

S'il est permis d'espérer, au point de vue de la vaccination des bovidés contre la tuberculose, quelques effets favorables du sérum d'animaux hyperimmuns pour la sensibilisation des bacilles atténués par cultures successives en présence de bile de bœuf, il faut avouer qu'en ce qui concerne l'action préventive ou thérapeutique de ce sérum nos expériences sur les cobayes et sur les bovidés ne sont pas encourageantes.

Pourquoi l'inoculation d'aussi fortes doses de notre bacille atténué à des générations qui n'en paraissent souffrir aucun dommage, et chez lesquelles il ne produit pas de lésions, ne confère-t-elle pas à leur sérum des propriétés analogues à celles qui caractérisent les sérum antimicrobiens ?

Ce que nous savons du bacille tuberculeux, de sa résistance toute spéciale aux actions digestives des leucocytes, nous porte à penser que sa résorption dans l'organisme, même lorsque sa virulence est atténuée, ne peut être qu'extrêmement difficile et en tous cas très lente. Il n'y a donc pas lieu de s'étonner que les sérum de tels animaux, de même que ceux des sujets

(1) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 4 juillet 1910.

humains porteurs de lésions tuberculeuses, se montrent doués de propriétés agglutinantes et précipitantes relativement si peu marquées ou même fréquemment nulles.

Mais alors, si la résorption des bacilles tuberculeux est si pénible, quel est le sort de ces quantités énormes de microbes qui, chaque mois, sont injectées dans les veines de nos animaux immunisés, et qui ne manifestent leur présence par aucun désordre apparent?

Plusieurs expérimentateurs, en particulier Schröeder et Cotton (1), ont insisté sur la faculté que possèdent les bovidés tuberculeux non porteurs de lésions ouvertes et réagissant simplement à la tuberculine, d'émettre des bacilles virulents dans leurs excréments. Philip et Porter (2) ont fait la même observation chez l'homme. Nous-mêmes avons montré (3) que des bacilles tuberculeux, injectés dans les veines d'un animal assez peu réceptif comme le lapin, sont retrouvés peu après dans la vésicule biliaire, d'où ils sont éliminés dans l'intestin.

C'est dans ce sens que nous avons dirigé nos recherches, en nous servant d'une de nos génisses hyperimmunisées.

**EXPÉRIENCE.** — Génisse bretonne âgée de trois ans, en cours d'immunisation avec le bacille bovin bilié, depuis le 21 mai 1909, avait reçu au moment de l'expérience rapportée ci-après, 2 gr. 165 de bacilles dans les veines. Son état de santé était très satisfaisant. Le 13 mars 1911, l'animal reçoit dans la jugulaire sa dernière inoculation de 200 milligrammes de bacilles biliés du 37<sup>e</sup> passage. Dès le lendemain, on commence l'épreuve des excréments par inoculation au cobaye. Pour ces inoculations, 1 gramme d'excréments très frais est dilué dans 10 centimètres cubes d'eau stérile; le tout est exprimé sur batiste fine, et 4 cobayes reçoivent chacun sous la peau de la cuisse 1 centimètre cube de cette dilution. Il est utile de faire remarquer que l'expérience est faite sur une quantité très faible d'excréments, si l'on considère que la quantité moyenne émise par l'animal en vingt-quatre heures est de 8 kilos.

Sur 120 animaux ainsi inoculés, 10 cobayes sont morts dans les premiers jours après l'inoculation, d'infection locale. L'observation des 110 animaux restants a été faite quarante-cinq jours après l'inoculation sous-cutanée de la dilution d'excréments. 73 cobayes sont à ce moment porteurs de l'adénite spécifique. De ces derniers, 51 avaient été inoculés dans les quinze jours qui ont suivi l'injection de 200 milligrammes de bacilles biliés à la génisse. Il semble donc que, plus on s'éloigne du moment de l'infection, plus les bacilles

(1) SCHROEDER et COTTON, Bureau of animal Industry, Washington. *Bull.*, n° 99, 1907.

(2) PHILIP et PORTER, *British Med. Journal*, 1910.

(3) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 8 mars 1909.

diminuent dans les excréments. Cependant, trente jours après l'inoculation de la génisse, 2 cobayes sur 4 présentaient l'adénite inguinale. Ce délai de trente jours est donc insuffisant pour que l'animal puisse se débarrasser de cette quantité énorme de 200 milligrammes de bacilles.

La santé des 73 cobayes ainsi infectés reste parfaite et, au 75<sup>e</sup> jour après l'inoculation, aucun d'eux n'est mort. Ils sont tous sacrifiés, et ceux qui sont porteurs de l'adénite montrent à l'autopsie des ganglions sous-lombaires caséux et, pour un certain nombre, des lésions discrètes de la rate, du foie et des poumons. La présence de ces lésions discrètes atteste cependant que, comme nous l'avions déjà constaté dans d'autres expériences rapportées précédemment, la virulence du bacille bilié d'origine s'est sensiblement accrue par son passage dans l'organisme du bovidé immunisé; en effet, 4 cobayes inoculés sous la peau, le même jour que la génisse, avec 1 milligramme de bacilles biliés du même passage (37<sup>e</sup>) et sacrifiés soixante-quinze jours après, sont en excellent état, et, à part la présence d'un gros ganglion inguinal, on ne peut déceler aucune lésion tuberculeuse dans les organes. Peut-être cette augmentation de virulence est-elle la manifestation du contact *in vivo* des bacilles biliés injectés avec le sérum de la génisse, sérum dont nous avons indiqué les propriétés.

Le 14 avril, c'est-à-dire trente jours après l'inoculation des bacilles biliés, la génisse reçoit dans les veines 10 milligrammes de bacilles bovins virulents. A part l'élévation ordinaire, brutale, de la température dans les premières heures qui suivent l'inoculation, la génisse reste dans un état parfait de santé.

Comme précédemment, on continue dans les mêmes conditions l'inoculation quotidienne de 4 cobayes pendant vingt-quatre jours consécutifs, en suivant la technique indiquée plus haut. Sur 96 cobayes inoculés, 16 sont morts dans les premiers jours après l'injection, d'infection septique. L'observation des 80 animaux restants a été faite quarante-cinq jours après l'inoculation sous-cutanée de la dilution d'excréments. 55 cobayes sont trouvés porteurs de l'adénite spécifique. En outre du ganglion induré, la plupart montrent, au niveau du point inoculé, une lésion en voie de suppuration. Six de ces lésions locales sont déjà ouvertes; les cobayes s'amaigrissent avec rapidité. 13 sont morts, du 52<sup>e</sup> au 68<sup>e</sup> jour après l'inoculation, de tuberculose généralisée. Les autres sont sacrifiés au 75<sup>e</sup> jour. 57 sont porteurs de lésions viscérales étendues dont la gravité ne peut être comparée avec celle des lésions discrètes produites dans le même délai par les dilutions d'excréments ne contenant que des bacilles biliés. Il n'est pas douteux que, seuls, les bacilles tuberculeux virulents, rejettés avec les excréments après l'inoculation à la génisse de 10 milligrammes de tuberculose d'épreuve (souche lait, de Nocard), sont susceptibles de produire les lésions généralisées que nous avons observées chez ces cobayes.

Pour clore cette expérience, la génisse utilisée a été abattue soixante jours après l'inoculation virulente de 10 milligrammes de bacilles. L'animal était en excellent état d'embonpoint. L'examen le plus minutieux des organes n'a pas permis de déceler la moindre trace de lésion tuberculeuse. Toutefois les ganglions bronchiques, triturés et inoculés à 12 cobayes, renfermaient encore des bacilles qui provoquèrent l'évolution de la tuberculose chez ces animaux.

## III

ÉLIMINATION DES BACILLES PAR L'INTESTIN  
CHEZ LES ANIMAUX TUBERCULEUX.

Nous nous sommes demandé si les sujets déjà tuberculés ne possédaient pas, eux aussi, cette remarquable faculté des organismes rendus artificiellement résistants à l'infection tuberculeuse, d'éliminer en nature les bacilles tuberculeux avec leurs excréments, et si ce phénomène n'était point en relation étroite avec leur aptitude à résister aux réinfections. Nous avons cherché à nous en rendre compte par l'expérience suivante, réalisée sur un bovidé tuberculeux, porteur de lésions évidentes :

**EXPÉRIENCE.** — Vache hollando-flamande, âgée de sept ans, ayant réagi à la tuberculine chez son propriétaire. Une seconde tuberculination faite à son arrivée à l'Institut est également positive (2<sup>o</sup>4); de plus, à l'auscultation, on peut affirmer qu'il existe des lésions étendues des deux poumons. Néanmoins, l'animal est en bon état d'embonpoint; sa température est normale. Pendant trente jours consécutifs, 4 cobayes sont inoculés chaque jour avec une dilution d'excréments suivant la technique que nous avons précédemment indiquée; puis la vache reçoit dans les veines, en une seule dose, 10 milligrammes de bacilles bovins virulents (souche lait, de Nocard). Une violente hyperthermie se manifeste dès la cinquième heure, pour atteindre son maximum à la neuvième (40<sup>o</sup>9); puis la température reste le soir autour de 40 degrés pendant sept jours, et tout rentre dans l'ordre. L'appétit est toujours satisfaisant. Pendant trente jours consécutifs à partir de celui de l'inoculation, 4 cobayes sont inoculés chaque jour sous la peau avec une dilution d'excréments. Sur 113 cobayes inoculés au cours des trente jours qui ont précédé l'inoculation virulente, 7 sont porteurs, au 45<sup>o</sup> jour; de l'adénite spécifique. Sur 109 cobayes inoculés au cours des trente jours qui ont suivi l'inoculation, 47 sont porteurs, au 45<sup>o</sup> jour, de l'adénite spécifique.

La vache, abattue le 60<sup>o</sup> jour après l'injection intraveineuse, montre à l'autopsie des lésions étendues calcifiées des deux poumons, surtout dans le droit; les ganglions bronchiques et médiastinaux sont quadruplés de volume et farcis de lésions tuberculeuses. À part deux petites lésions tuberculeuses anciennes du foie, les viscères de la cavité abdominale sont indemnes. L'examen le plus minutieux des parties saines des poumons ne permet pas de déceler la moindre trace de tubercules miliaires jeunes qui auraient été la signature de la réinfection.

Cette vache tuberculeuse se trouvait, au point de vue de la résistance à l'infection, dans un état que l'on peut rapprocher de celui de l'animal hyperimmun dont il a été fait mention

plus haut. Elle avait acquis l'aptitude à éliminer des bacilles avec ses excréments. La dose énorme de 10 milligrammes de bacilles virulents que nous lui avons injectée dans les veines n'a pas provoqué chez elle d'aggravation des lésions qu'elle portait déjà et, après cette réinfection, elle a évacué avec ses fèces une plus grande quantité de bacilles qu'auparavant. La preuve en est fournie par ce fait que 7 cobayes seulement ont été infectés sur 113 inoculés avec les déjections avant l'injection virulente, tandis qu'après celle-ci, 47 cobayes sur 109 ont pris la tuberculose.

La constatation des résultats qui précèdent nous a conduits à rechercher quel est le sort des bacilles tuberculeux chez les bovidés atteints de septicémie bacillaire ou *typho-bacille* expérimentale non mortelle (forme de tuberculose si bien individualisée chez l'homme par Landouzy, et que nous reproduisons aisément chez les animaux de l'espèce bovine avec nos bacilles cultivés en séries successives sur bile de bœuf).

**EXPÉRIENCE.** — Génisse bretonne, âgée de six mois, indemne de tuberculose, reçoit dans la jugulaire, en une seule dose, 100 milligrammes de bacilles biliés du 27<sup>e</sup> passage. La température reste normale jusqu'au 6<sup>e</sup> jour. A partir de ce moment, elle s'élève brusquement pour se maintenir aux environs de 40° pendant vingt-quatre jours consécutifs, en même temps que l'état général se modifie. L'appétit est considérablement diminué, l'amincissement est rapide; le nombre des mouvements respiratoires varie de 30 à 50 par minute; l'animal fait entendre fréquemment une petite toux brève. A partir du vingt-quatrième jour, la température s'abaisse lentement; l'état général devient meilleur; l'appétit réapparaît, les mouvements respiratoires reprennent leur rythme normal; la génisse reprend du poids, et c'est dans un excellent état de santé qu'elle est abattue, sept mois après l'inoculation. Pendant tout ce temps, l'épreuve de la virulence de ses excréments est effectuée par inoculation au cobaye, suivant la technique que nous avons indiquée. A partir du premier jour de l'expérience, 4 cobayes sont inoculés tous les dix jours. Les cobayes inoculés les 1<sup>er</sup> et 10<sup>e</sup> jours restent indemnes; 2 sur 4 inoculés le 20<sup>e</sup> jour après le début de l'expérience présentent l'adénite spécifique; puis, pendant quatre mois, bien que la santé de la génisse soit redevenue parfaite, 32 sur 44 des cobayes inoculés sont porteurs de l'adénite inguinale. On n'en observe plus que 4 sur 18 pendant les deux mois qui suivent. Au moment de l'abatage, sept mois après le début de l'expérience, la génisse émettait encore des bacilles dans ses excréments.

A l'autopsie, l'examen le plus minutieux de tous les organes et de tous les ganglions ne permet pas de déceler la moindre lésion tuberculeuse. Cependant, à l'inoculation, les ganglions bronchiques renferment encore des bacilles (2 cobayes sur 8 présentèrent l'adénite spécifique).

Parallèlement aux expériences précédentes, nous avons enfin

recherché comment se comportait, quant à cette élimination des bacilles avec les excréments, un bovidé indemne de tuberculose et soumis à une inoculation intraveineuse d'une quantité de bacilles virulents déterminant une infection rapidement mortelle.

**EXPÉRIENCE.** — Veau mâle âgé de cinq mois, de race flamande, indemne de tuberculose, reçoit dans la veine jugulaire 5 milligrammes de bacilles bovins virulents (souche lait, de Nocard). L'animal présente le tableau clinique connu. Élévation de température à partir du 13<sup>e</sup> jour. Perte de l'appétit. Amaigrissement. Toux fréquente, mouvements respiratoires accélérés. Le veau, incapable de se lever, est abattu *in extremis* le 32<sup>e</sup> jour après l'inoculation. L'autopsie montre que les organes et ganglions de la cavité abdominale paraissent sains. Les deux poumons sont farcis d'un nombre incalculable de tubercules dont les plus gros atteignent la dimension de la tête d'une épingle ; beaucoup sont translucides ; un certain nombre, les plus gros, déjà caséux au centre. Les ganglions bronchiques et médiastinaux, décuplés de volume, renferment des amas de follicules tuberculeux caséux. Quatre jours avant l'inoculation de ce veau et pendant les trente et un jours de sa maladie, quatre cobayes ont été inoculés chaque jour avec la dilution d'excréments préparée comme nous l'avons indiqué.

Des 16 cobayes inoculés avant le début de l'expérience, 2 sont morts d'infection septicémique ; les 14 restants sont, au 45<sup>e</sup> jour, absolument indemnes de lésion locale. Des 124 cobayes inoculés après l'injection bacillaire infectante, 40 sont morts d'infection septicémique dans les quatre premiers jours. L'observation des 84 cobayes restants, faite soixante-quinze jours après l'inoculation de la dilution d'excréments, a montré que *onze* seulement sont infectés, *Les soixante-treize* autres sont indemnes.

Le premier des cobayes infectés avait reçu les excréments du 16<sup>e</sup> jour après l'inoculation du veau ; 1 les excréments du 19<sup>e</sup> jour ; 1 ceux du 25<sup>e</sup> jour ; 1 ceux du 27<sup>e</sup> ; 1 ceux du 29<sup>e</sup> ; 2 ceux du 30<sup>e</sup> ; 2 ceux du 31<sup>e</sup> et 2 ceux du 32<sup>e</sup> jour, date de l'abatage *in extremis* de l'animal.

Donc, pendant les 15 premiers jours, c'est-à-dire durant toute la période pendant laquelle le veau a lutté contre l'infection en constituant ses lésions folliculaires, il n'a éliminé aucun bacille. Cette élimination n'a commencé à s'effectuer (d'ailleurs très faiblement si on la compare à celle que nous avons observée chez les animaux vaccinés ou tuberculeux résistants aux réinfections) que trois jours après le début de la période fébrile de la maladie, c'est-à-dire lorsque les tubercules caséifiés ont libéré dans la circulation un grand nombre de bacilles. Elle s'est ensuite poursuivie jusqu'à la fin de la maladie.

#### CONCLUSIONS

**I. —** *Le sérum des bovidés hyperimmunisés contre la tuberculose par injections intraveineuses répétées de bacilles modifiés par cultures en séries sur bile de bœuf, ne s'est montré, dans les conditions de nos expériences, ni préventif ni curatif de la*

*tuberculose chez le cobaye.* En mélange avec des bacilles atténusés ou virulents, ce sérum favorise manifestement la rapidité d'évolution et l'extension des lésions chez cet animal.

II. — Ce même sérum, injecté à haute dose aux bovidés, n'exerce aucune action nettement favorable, préventive ou thérapeutique. Il paraît seulement retarder l'évolution de la maladie et favoriser l'élimination des bacilles par les émonctoires normaux de l'organisme (foie et intestin).

III. — Les bovidés hyperimmuns ont acquis la faculté d'éliminer en nature avec les excréments, non seulement les bacilles atténusés, mais aussi les bacilles virulents d'épreuve, ces derniers ne provoquant, au cours de leur passage dans l'organisme, aucune lésion tuberculeuse.

IV. — Les bovidés atteints de tuberculose sont doués de cette même faculté à laquelle paraît être liée leur résistance aux réinfections expérimentales.

V. — Les bovidés atteints de typho-bacille expérimentale curable guérissent sans lésions et émettent, à partir de la convalescence, des bacilles tuberculeux avec leurs excréments pendant plus de sept mois.

VI. — Les bovidés indemnes de tuberculose et expérimentalement infectés par une quantité de bacilles tuberculeux susceptible de déterminer une maladie aiguë à évolution rapidement mortelle, ne possèdent la faculté d'émettre des bacilles en nature avec leurs excréments qu'après le début de la phase fébrile et jusqu'à la fin de la maladie. Pendant toute la période de lutte apyrétique, c'est-à-dire tant que les lésions tuberculeuses ne sont pas caséifiées et suppurantes, aucun bacille n'est éliminé par la voie hépatico-intestinale.

\* \* \*

Les nombreuses expériences que nous avons effectuées depuis plusieurs années, tant sur l'infection tuberculeuse expérimentale que sur la vaccination des bovidés, et celles relatées dans le présent mémoire, nous portent à admettre que *la plus ou moins grande résistance conférée aux bovidés à l'égard de la tuberculose par l'emploi des diverses méthodes de vaccination*

*préconisées depuis Behring (y compris celle que nous étudions actuellement et qui repose sur l'emploi de bacilles d'origine bovine modifiés par cultures successives sur bile de bœuf), paraît être sous la dépendance de la plus ou moins grande aptitude acquise par l'organisme des animaux d'éliminer les bacilles tuberculeux, en nature, avec les déchets cellulaires, par la voie hépatico-intestinale.*

Tant que cette aptitude persiste, — et elle peut être plus ou moins fugace, — les bacilles tuberculeux se comportent, à l'égard des organismes résistants, non comme des parasites actifs, susceptibles de provoquer des réactions de défense (lésions folliculaires), mais comme de simples corps étrangers inoffensifs que les émonctoires naturels de ces corps étrangers évacuent à l'extérieur.

## NOTE A PROPOS DU MÉMOIRE DE M. CHAUSSÉ

par A. CALMETTE et C. GUÉRIN.

Le mémoire qui précède était écrit lorsque nous avons pris connaissance du travail de M. Chaussé paru dans ces Annales sous le titre : *La tuberculose thoracique du bœuf n'est pas d'origine digestive* (1).

Nous avons précédemment exposé dans ce même recueil les nombreuses expériences sur lesquelles s'appuie la conviction que nous sommes dans la vérité scientifique, en affirmant après von Behring, avec Ravenel, Aufrecht, Klebs et beaucoup d'autres expérimentateurs, que chez les bovidés et chez tous les animaux sensibles à la contagion tuberculeuse, y compris l'homme, « la tuberculose pulmonaire résulte dans l'immense majorité des cas d'une infection primitivement lymphatique, puis sanguine, ayant son origine dans l'absorption de bacilles tuberculeux par la voie digestive ».

Cette conviction ne se trouve pas ébranlée par les faits que rapporte M. Chaussé et dont il nous paraît nécessaire de discuter l'interprétation.

Lorsque M. Chaussé place ses animaux (veaux, moutons) dans une salle de 45 mètres cubes, dans l'atmosphère de laquelle il répand avec un pulvérisateur Richardson des particules de crachats tuberculeux ou de matières caséuses, de telle sorte que l'air pénétrant dans les poumons renferme sûrement de nombreux bacilles, il réalise à coup sûr l'infection pulmonaire d'emblée, primitive. Nous l'avons réalisée nous-mêmes maintes fois dans des conditions analogues, et nous pensons qu'elle se produit dans certaines circonstances, — que nous croyons exceptionnelles, — par exemple chez le jeune enfant dont la mère ou la nourrice, atteinte de tuberculose pulmonaire grave, tousse devant sa bouche ouverte, en quête

(1) Ces *Annales*, 25 juillet 1911.

du sein qui va l'allaiter. Dans de tels cas, particulièrement rares, l'infection d'origine aérienne se manifeste par des lésions de tuberculose dont les foyers primitifs sont *intra-alvéolaires* et dont l'évolution rapide aboutit bientôt à la caséification, à la fonte purulente : c'est la *pneumonie caséuse du jeune âge*.

Les lésions expérimentales produites par l'inhalation de crachats frais ou de cultures finement divisées présentent des caractères analogues. Elles se constituent *primitivement dans les alvéoles*, et nous avons pu suivre leur formation chez le cobaye en sacrifiant les animaux deux jours, quatre jours, etc., jusqu'à deux semaines après une seule inhalation infectante.

Il est alors facile de constater que les bacilles qui ont pénétré dans une alvéole y déterminent bientôt un afflux de leucocytes polynucléaires, puis une véritable desquamation des cellules épithéliales de la paroi, et le tout forme bientôt, au centre de l'alvéole, un amas qui s'organise en follicule tuberculeux. Celui-ci ne tarde pas à se caséifier et le début de cette maturation du tubercule est immédiatement révélé par l'engorgement du ganglion lymphatique le plus voisin.

*L'évolution de ces lésions primitivement alvéolaires est toujours rapide*, même chez les grands animaux. Ce sont des lésions de cette nature qu'a réalisées M. Chaussé dans ses expériences sur les moutons (qui portaient déjà 35 et 38 jours après l'unique séance d'inhalation 300 tubercules en voie de caséification et des ganglions bronchiques caséifiés), et dans ses expériences sur les veaux (dont l'un au bout de 90 jours montrait de véritables abcès tuberculeux gros comme des noisettes, avec des ganglions pulmonaires caséux et des végétations sur les deux plèvres).

Ce sont également des lésions de même nature qu'avaient obtenues Nocard et Rossignol dans leurs expériences de 1900, lorsqu'ils faisaient inhale à leurs bovidés des poussières d'émulsion tuberculeuse, et qu'ils trouvaient déjà deux mois après les poumons farcis de tubercules.

Or, ces lésions ne ressemblent en aucune manière à celles que l'on observe soit après l'infection expérimentale par voie intraveineuse, soit après l'infection expérimentale par ingestion, et ces dernières sont identiques à celles que réalise l'infection naturelle. Leur point de départ est le plus souvent un

des fins capillaires qui entourent les bronchioles terminales ou qui rampent dans le tissu élastique périlobulaire. Autour d'un leucocyte parasité par des bactilles, d'autres leucocytes s'amasent et créent une véritable embolie qui, avec la participation de l'endothélium vasculaire, donne naissance au futur tubercule. Lorsque celui-ci est constitué, s'il évolue vers la caséification, son contenu de bactilles, de noyaux leucocytaires et de matière caséuse se déverse soit dans l'alvéole voisine dont la paroi finit par se rompre, soit dans un vaisseau sanguin, soit dans les lymphatiques avoisinants, et les bactilles ainsi libérés, aussitôt englobés par d'autres leucocytes, vont créer alors des foyers secondaires *dans les ganglions bronchiques, dans les alvéoles, dans d'autres capillaires du poumon ou dans des organes plus éloignés.*

Tout ce processus s'accomplice avec une lenteur qui contraste avec la rapidité d'évolution des tubercules primitivement alvéolaires. On peut l'étudier comme nous l'avons fait, en inoculant par voie intraveineuse au cobaye de très petites doses de bactilles, par exemple un millionième de milligramme. Les animaux résistent à l'infection pendant des mois, et il n'est alors pas rare de voir se constituer dans le poumon de véritables *cavernes* entourées de tissu fibreux, présentant la plus grande analogie avec les lésions habituellement rencontrées dans la tuberculose pulmonaire chronique de l'homme.

L'infection par ingestion réalise ce même processus. L'objection invoquée par M. Chaussé, après Flügge et son élève Findel, que la quantité de microbes nécessaire pour la produire est beaucoup plus grande que celle qui suffit à infecter par inhalation (un seul bacille d'après M. Chaussé), n'est pas soutenable, car rien ne prouve qu'un seul bacille, absorbé par les chylifères de l'intestin et déversé dans la circulation lymphatique, puis sanguine, ne suffise pas lui aussi à créer plus tard une lésion tuberculeuse dans le poumon ou dans tout autre organe. Fort heureusement, tous les microbes ingérés ne sont pas absorbés. Un très petit nombre d'entre eux seulement franchissent la muqueuse intestinale. Mais la réalité de cette pénétration ne laisse plus place au doute, et l'on sait aujourd'hui, après les travaux de Schottmuller et de très nombreux expérimentateurs, sans parler des nôtres, que non seule-

ment le virus tuberculeux, mais aussi le bacille typhique, les paratyphiques, le pneumocoque, les staphylocoques, le virus de la poliomylérite épidémique même, s'introduisent dans le sang par la voie digestive. Enfin les vétérinaires savent également que la morve pulmonaire, maladie du système lymphatique, si proche parente de la tuberculose, est le plus généralement contractée par ingestion, et qu'il suffit à un cheval d'absorber quelques bacilles morveux dans l'eau de boisson pour développer chez lui des lésions de granulie morveuse aiguë disséminées dans toute l'étendue des deux poumons.

M. Chaussé se montre vivement préoccupé de démontrer l'exactitude constante de la *loi de Conheim*. Toutes les notes qu'il a publiées avant son mémoire accusaient déjà cette préoccupation. Or, il se trouve que ses propres expériences démontrent que la loi dont il s'agit est en défaut dans 51 p. 100 des cas. Il nous dit lui-même que la perméabilité de l'intestin sans réaction des ganglions mésentériques « n'existe que chez la moitié des sujets » et que 49 p. 100 de ces derniers seulement ont, dès le début, des tubercules mésentériques. Il ajoute, il est vrai, que « la perméabilité sans réaction chez cette moitié des sujets n'est que temporaire; qu'en d'autres termes le ganglion ne manque de réagir qu'à une première infection », mais qu'il réagit par la suite, secondairement, « par auto-infection ».

C'est donc que la *loi de Conheim* est désuète, et nous estimons qu'en effet elle ne répond pas à la réalité des faits actuellement connus.

Nous croyons avoir suffisamment démontré, et de nombreux auteurs ont prouvé également, que les ganglions mésentériques retiennent parfois pendant très longtemps des bacilles tuberculeux sans que ceux-ci créent de lésions folliculaires macroscopiquement ou microscopiquement visibles. Les bacilles restés ainsi *latents* disparaissent à la longue, soit qu'ils soient détruits par les lymphocytes (J. Bartel), soit qu'ils soient déversés, avec les phagocytes qui les véhiculent, dans la circulation lymphatique et sanguine, arrêtés plus tard dans quelque capillaire du poumon ou de tout autre organe, ou éliminés par le foie avec les pigments biliaires et les autres déchets de l'organisme. Le mémoire que nous publions ci-

dessus a justement pour objet de préciser les conditions de cette élimination.

Dans tous les cas, les infections non productrices de lésions folliculaires, c'est-à-dire les infections *latentes*, dont l'extrême fréquence nous est aujourd'hui révélée par les réactions tuberculiniques positives chez un si grand nombre de sujets sains, ne s'accompagnent d'aucune réaction *locale* ni d'aucune réaction *ganglionnaire au voisinage du point de pénétration du virus infectant*. Dans ces infections latentes, le bacille se comporte comme un saprophyte que les cellules leucocytaires véhiculent plus ou moins longtemps à travers l'organisme, sans que ce dernier en soit autrement incommodé. Une lésion ganglionnaire n'apparaît que lorsqu'un tubercule se constitue primitivement dans le ganglion lui-même ou lorsque ce ganglion est appelé à « filtrer » la lymphe provenant d'un tubercule caséux développé dans son « territoire ». C'est seulement dans ce sens que la *loi de Parrot*, ou loi des adénopathies similaires, et aussi la *loi de Conheim*, peuvent être considérées comme exactes.

Nous sommes donc très loin de la conception qu'a développée M. Chaussé dans son mémoire et, contrairement à ses conclusions, nous restons convaincus par nos propres expériences que les lésions caractéristiques de la tuberculose pulmonaire dite *primitive* résultent d'une ou plusieurs infections récentes ou anciennes, *le plus souvent d'origine intestinale*.

**SUR LE PASSAGE  
DE L'ANTITOXINE DIPHTÉRIQUE ET TÉTANIQUE  
DANS L'HUMEUR AQUEUSE**

par V. MORAX et G. LOISEAU.

De nombreuses expériences ont été faites dans le but de rechercher si les anticorps passent du sang dans l'humeur aqueuse. Le problème offre en effet un double intérêt : intérêt de physiologie générale, parce que nous ignorons comment les substances immunisantes se répartissent dans les tissus, et en dehors des espaces vasculaires, dans les conditions normales ; intérêt de physiologie oculaire, en raison des obscurités qui existent encore sur la nature de l'humeur aqueuse considérée par les uns comme le produit d'une sécrétion, par les autres comme le résultat d'une simple filtration.

Généralisant d'emblée les données du problème, la plupart des expérimentateurs qui se sont occupés de cette question ont cherché, à l'aide de méthodes indirectes, à déterminer chez les animaux immunisés activement ou passivement la présence d'hémolysines, d'agglutinines, de précipitines, de substances bactéricides, etc., pour en déduire ce qu'ils ont appelé les conditions d'immunité de la chambre antérieure. Ils ont, par contre, presque toujours négligé la recherche des antitoxines, si bien que nous ne sommes pas encore à même d'affirmer si, dans les conditions normales de l'appareil visuel, l'antitoxine diphtérique ou tétanique se retrouve en quantité appréciable dans l'humeur aqueuse des animaux immunisés. C'est là le problème que nous nous sommes proposé de résoudre.

Sans connaître la nature de l'antitoxine diphtérique ou tétanique, nous avons des procédés expérimentaux qui permettent d'en démontrer la présence et même d'en préciser la quantité relative. Il est aussi aisé en effet de faire le titrage en antitoxine de l'humeur aqueuse que du sérum, à la condition cependant de faire le prélèvement sur un grand animal comme

le cheval, de l'œil duquel on extrait facilement 1 et même 2 centimètres cubes d'humeur aqueuse.

#### TECHNIQUE OPÉRATOIRE.

MM. Roux et Martin ont bien voulu mettre à notre disposition des chevaux immunisés pour l'obtention du sérum anti-diphétique ou antitétanique.

MM. Prévost, Barbier et Pernin nous ont été de précieux collaborateurs et nous tenons à les remercier de leur extrême complaisance.

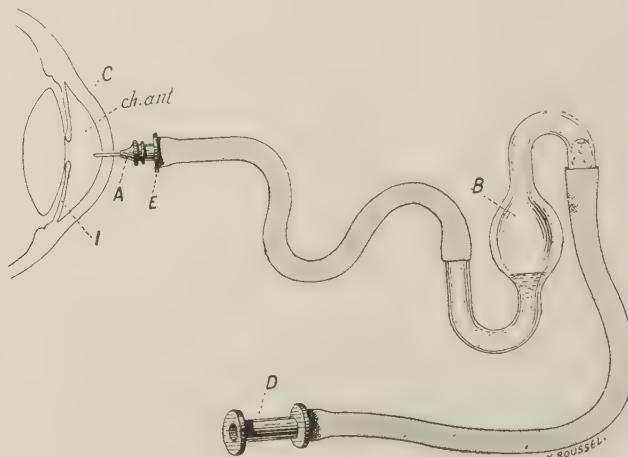


FIG. 1. — Dispositif pour le prélèvement de l'humeur aqueuse.

En haut et à gauche, coupe de l'œil du cheval montrant la situation de l'aiguille sur une coupe antéro-postérieure.

C, cornée; I, iris; Ch. ant., chambre antérieure. — L'aiguille (A) est fixée à frottement sur un embout (E), et celui-ci réuni à l'ampoule de verre B par un tube en caoutchouc. — D, pavillon pour l'aspiration.

Le cheval étant immobilisé par l'application d'un garrot, on instille deux gouttes de collyre au chlorhydrate de cocaïne à 1/50 dans le sac conjonctival, puis on fait une rapide irrigation des culs-de-sac conjonctivaux avec la solution physiologique de chlorure de sodium stérilisée.

En écartant les paupières avec une main, on transfixe la cornée avec une fine et courte aiguille adaptée sur le petit appareil dont la figure 1 montre suffisamment la disposition. La brièveté de l'aiguille empêche la blessure du cristallin ou de l'iris, d'ailleurs facilement évitable si l'on a quelque habitude de la chirurgie oculaire. Le tube de caoutchouc qui réunit l'ampoule de verre à l'aiguille permet d'éviter tout tiraillement de la cornée, l'œil du cheval

n'étant jamais complètement immobilisé. D'autre part, le caoutchouc qui réunit l'ampoule aux lèvres de l'opérateur rend possible une aspiration délicate et continue.

Comme nous l'avons fait dans quelques-unes de nos premières expériences, on peut aussi se servir d'une seringue à frottement très doux, mais les résultats sont moins constants et, si l'animal n'est pas très docile, il arrive que le prélèvement soit imparfait ou qu'un traumatisme cornéen fausse les résultats d'une deuxième ou troisième ponction. L'appareil que nous indiquons nous a permis de répéter les ponctions un grand nombre de fois sur le même animal sans qu'il en résultât aucun inconvenient pour l'œil.

#### RECHERCHES SUR L'ANTITOXINE DIPHTÉRIQUE.

Nos premières expériences ont porté sur l'antitoxine diphtérique.

Nous avons choisi des chevaux à différents degrés d'immunisation et dont le sérum présentait des pouvoirs antitoxiques assez dissemblables.

Le titre du sérum antidiphthérique est exprimé en unités d'après la notation d'Ehrlich.

En disant que le sérum titre 800 unités, on traduit ce fait que 1/800 de centimètre cube neutralise, *quo ad mortem*, une dose déterminée de toxine (le **L** + ou limite mortelle d'Ehrlich). Cette dose correspondait presque exactement à dix doses mortelles pour le cobaye, ou à treize doses mortelles pour le pigeon, de la toxine diphtérique qui nous a servi à titrer l'antitoxine de l'humeur aqueuse.

Quelques premiers essais nous avaient en effet montré que la faible proportion d'antitoxine contenue dans l'humeur aqueuse, rendait nécessaire l'épreuve des animaux avec des doses inférieures à celles qui sont utilisées pour titrer le sérum. Nous nous sommes servis du cobaye et du pigeon et nous avons injecté des animaux témoins pour chaque groupe d'expériences. Nous en relaterons quelques-unes dans les tableaux que l'on trouvera plus loin.

Dans l'expérience I, on voit que l'humeur aqueuse, injectée à la dose de 1/5 de centimètre cube, a neutralisé une dose de toxine diphtérique qui tuait le cobaye en cinq jours et demi.

Avec le pigeon comme animal réactif au lieu du cobaye, cette même quantité d'humeur aqueuse a retardé la mort de sept jours : le pigeon qui reçut l'humeur aqueuse et une dose de

TABLEAU I. — Expériences sur l'antitoxine diphtérique.

N° de l'expé- rience.	DÉSIGNATION du cheval et de l'œil ponctionné.	DATE de l'expérience.	QUANTITÉ d'humeur aqueuse prélevée.	QUANTITÉ d'humeur aqueuse injectée.	QUANTITÉ de toxine injectée.	ANIMAL réactif.	RÉSULTAT	TITRE de l'humeur aqueuse.
								800 L.
Diph. 72 OD Exp. I	1 c. c. 5	21 avril 1911	0 c. c. 2	1 dose mortelle.	Cobaye, 380 gr.	Résiste.	0,5	
		"	0 c. c. 2	3	400 gr.	+	0	
		"	0 c. c. 2	3	420 gr.	+	0	
		"	0 c. c. 2	10	470 gr.	+	0	
		"	0 c. c. 2	20	480 gr.	+	0	
		"	0 c. c. 2	4	420 gr.	+	0	
		"	0 c. c. 2	3	650 gr.	+	0	
		"	0 c. c. 2	1	Pigeon.	11 jours	0	
		"	0 c. c. 2	3	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	5	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	10	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	20	—	+	0	
Diph. 71 OG Exp. II	1 c. c. 5	28 avril 1911	0 c. c. 2	4 dose mortelle.	Pigeon.	Résiste.	0,5	
		"	0 c. c. 2	3	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	5	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	10	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	20	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	5	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	3	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	5	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	10	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	20	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	5	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	3	—	+	0	
Diph. 13 OD Exp. III	2 c. c. 5	21 avril 1911	0 c. c. 2	4 dose mortelle.	Pigeon.	Résiste.	0,5	
		"	0 c. c. 2	3	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	5	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	10	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	1	Pigeon.	Résiste.	0	
		"	0 c. c. 2	3	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	5	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	10	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	20	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	5	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	3	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	5	—	+	0	
Diph. 13 OG Exp. III	1 c. c. 5	21 avril 1911	0 c. c. 2	4 dose mortelle.	Pigeon.	Résiste.	0,5	
		"	0 c. c. 2	3	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	5	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	10	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	1	Pigeon.	Résiste.	0	
		"	0 c. c. 2	3	—	+	0	
Diph. 13 OG Exp. III	2 c. c. 5	20 min. après inj. sous-con- jonctif. d'une solut. de NaCl à 6 P. 100.	0 c. c. 2	4 dose mortelle.	Pigeon.	Résiste.	0,5	
		"	0 c. c. 2	3	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	5	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	10	—	+	0	
		"	0 c. c. 2	1	Pigeon.	Résiste.	0	
		"	0 c. c. 2	3	—	+	0	

toxine mourut le onzième jour, alors que le témoin mourait en quatre jours et demi.

Le pigeon se montre par conséquent, vis-à-vis de la toxine diphtérique, plus sensible que le cobaye.

Le cheval qui a fourni cette humeur aqueuse avait un sérum contenant 800 unités antitoxiques.

On peut se faire une idée approximative du rapport existant entre la teneur en antitoxine du sérum et de l'humeur aqueuse en disant que si 0,2 centimètre cube d'humeur aqueuse neutralise une dose de toxine, il ne faut que 0,000125 centimètre cube de sérum pour neutraliser une dose égale.

Le rapport est comme 1 à 1.600 pour le cheval 72.

Nous devons admettre par conséquent qu'il y a 1.600 fois moins d'antitoxine dans l'humeur aqueuse que dans le sérum; mais on aurait tort de généraliser cette indication, et l'expérience III en est la démonstration.

Le cheval 43 avait un sérum peu actif, titrant 250 unités antitoxiques, et cependant l'humeur aqueuse, prélevée dans les mêmes conditions, dans l'œil droit, a neutralisé, à la dose de 1/5 de centimètre cube, une dose mortelle pour le cobaye (témoin mort en trois jours et demi).

Ici le rapport n'est plus le même : 0,2 centimètre cube d'humeur aqueuse neutralise une dose mortelle, alors qu'il ne faut que 0,0004 de sérum pour neutraliser la même dose.

Le rapport est comme 1 à 500.

Pour l'œil gauche du cheval 43, il a été fait, vingt minutes avant la ponction, une injection sous-conjonctivale d'eau salée à 6 p. 100. Malgré cette injection, le titre en antitoxine de l'humeur aqueuse n'a subi aucune variation appréciable. Nous aurons d'ailleurs l'occasion de revenir sur ce point lorsque nous nous occuperons de l'antitoxine tétanique.

#### RECHERCHES SUR L'ANTITOXINE TÉTANIQUE.

La toxine et l'antitoxine tétaniques constituent des tests infinitésimales plus sensibles que la toxine et l'antitoxine diphtérique. On obtient aisément des toxines actives à des doses infinitésimales et des sérum dont la cent millième partie d'un centimètre cube neutralise 100 doses mortelles. Il était donc

vraisemblable, *a priori*, que l'étude de l'humeur aqueuse des chevaux fournisseurs de sérum antitétanique nous amènerait à des résultats encore plus précis.

Lorsqu'on éprouve l'activité d'un sérum antitétanique, on recherche quelle fraction de centimètre cube neutralisera l'effet d'une dose 100 fois supérieure à la dose mortelle pour le cobaye. Nous avons procédé d'une manière analogue pour l'appréciation du titre en antitoxine de l'humeur aqueuse, avec cette seule différence que nous avons pris pour test habituel une dose mortelle pour le cobaye, c'est-à-dire la quantité de toxine tétnique qui, injectée dans les muscles de la patte, tue le cobaye de 300 grammes dans un temps moyen de 5 à 6 jours.

Comme pour le titrage du sérum, le mélange de toxine et d'humeur aqueuse est laissé en contact pendant trente minutes avant d'être injecté dans la patte du cobaye.

On trouvera, dans les tableaux suivants, les résultats intégraux des expériences faites pour le dosage de l'humeur aqueuse. Nous nous sommes, par contre, contentés d'indiquer le titre trouvé pour le sérum. Lorsque nous disons qu'un sérum tient à 10.000, nous exprimons le fait que 1/10.000 de centimètre cube a neutralisé dans les conditions indiquées plus haut 100 doses mortelles pour le cobaye. C'est là, évidemment, un chiffre relatif, et si nous en avons rapproché le chiffre relatif du pouvoir antitoxique de l'humeur aqueuse, c'est pour que l'on se représente plus aisément le rapport existant entre le sérum et l'humeur aqueuse.

Nous avons eu soin de faire coïncider les prélèvements d'humeur aqueuse avec les prélèvements de sérum. Dans un petit nombre d'expériences seulement, l'animal réactif a été la souris au lieu du cobaye.

Les expériences IV à XIII démontrent d'une manière évidente la présence de l'antitoxine tétnique dans l'humeur aqueuse de chevaux immunisés. Mais alors même que le titre antitoxique du sérum est extrêmement élevé, le titre antitoxique de l'humeur aqueuse demeure très faible.

Nous voyons, par exemple, que chez le cheval D 81, dont le sérum titre 10.000 (1/10.000 de centimètre cube neutralise 100 doses mortelles), l'humeur aqueuse ne titre que 0,5 (1/10 centimètre cube neutralise 5 doses mortelles).

Elle atteint 1,25 chez les chevaux dont le sérum titre 100.000, mais il y a lieu de remarquer de suite que l'on ne peut établir qu'un parallélisme très relatif entre l'activité de l'humeur aqueuse et celle du sérum.

Les expériences relatées au troisième tableau ont eu pour but d'établir les modifications quantitatives que provoquent les ponctions successives sur le passage de l'antitoxine dans l'humeur aqueuse. On sait, en effet, que lorsqu'on ponctionne à nouveau l'humeur aqueuse, trente minutes ou une heure après un premier prélèvement, on obtient une deuxième humeur aqueuse dont les propriétés sont très différentes de la première et résultent du passage des albumines du sérum dans la chambre antérieure, en l'absence de toute hémorragie. Avec les albumines du sérum passent aussi les anticorps contenus dans ce liquide, et tous les observateurs ont signalé les différends existant entre la première et la deuxième humeur aqueuse pour ce qui est de la teneur en agglutinine, hémolysine, etc.

On voit, par ces expériences (exp. XIV, notamment), que l'humeur aqueuse prélevée trente minutes après une première ponction (exp. X) contient environ 400 fois plus d'antitoxine. Alors que 0.c. c. 2 de l'humeur aqueuse normale neutralise 5 doses mortelles, 0,025 de l'humeur aqueuse de deuxième ponction neutralise 50 doses mortelles.

On a démontré que l'humeur aqueuse reprenait assez rapidement ses propriétés normales et que, notamment, les substances albuminoïdes revenaient en moins de dix heures au taux normal. On a admis que l'humeur aqueuse se renouvelait assez vite et qu'il y avait un véritable courant de liquide entre l'iris et le corps ciliaire, organes supposés d'élaboration, et l'espace irido-cornéen où l'évacuation se produirait.

Ayant un test infiniment plus sensible que le dosage des albumines, nous avons cherché à nous rendre compte du temps nécessaire pour que l'excès d'antitoxine dans l'humeur aqueuse provoqué par la première ponction ait disparu, en d'autres termes pour que l'humeur aqueuse ait repris sa teneur normale.

Les expériences X, XV, XVII, XVIII établissent que l'antitoxine persiste longtemps en proportion anormale dans l'humeur aqueuse.

TABLEAU II. — Expériences sur l'antitoxine tétanique.

Humeur aqueuse normale (1<sup>re</sup> ponction).



TABLEAU III. — Expériences sur l'antitoxine tétanique. Humeur aqueuse anormale (2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> ponctions).

N° de l'expérience.	réservation du cheval.	DATE de l'expérience.	TEMPS écoulé entre les prélèvements.	QUANTITÉ d'humeur aqueuse injectée.	QUANTITÉ de toxine injectée.	ANIMAL réactif.	RÉSULTATS	TIÈRE de l'humeur atténue.	TIÈRE du serum
Exp. XIV	Tet. D 93 OD	31 mars 1911.	2 <sup>e</sup> humeur aqueuse 30 minutes après 1 <sup>re</sup> ponction (Exp. X).	0,1	5 10 25 50 100 200	Cobaye.	0 0 0 0 0 0	20	10.000
Exp. XV	Tet. D 93 OD	5 avril 1911.	3 <sup>e</sup> humeur aqueuse 5 jours après 1 <sup>re</sup> et 2 <sup>e</sup> ponctions (Exp. X et XIV).	0,01	3 5 10 25 50 100 200	Cobaye.	0 — — — — — —	3	10.000
Exp. XVI	Tet. D 98 OD	5 avril 1911.	2 <sup>e</sup> humeur aqueuse 5 jours après la 3 <sup>e</sup> ponction (Exp. X).	0,01	3 5 10 25 50 100 200	Cobaye.	— — — — — — —	Inérieur à 3.	1.000

Exp. XVII	Tét. D 95	OG	28 avril 1911	0,1	23 jours après la 2 <sup>e</sup> ponction (Exp. XIX) et 9 jours après la 2 <sup>e</sup> ponction	5 10 25 50 100 300	S. oris. — — — — — —	0 0 0 + 2 j. + 1 j. 1/2	5 5 5 5 5 5	100.000
Exp. XVIII	Tét. D 95	OD	28 avril 1911	0,4	4 <sup>e</sup> humeur aqueuse 23 jours après la ponction (Exp. XV).	5 40 50 100 200 300	Souris. — — — — — —	0 0 0 + 2 j. + 1 j. 1/2	5 5 5 5 5 5	100.000
Exp. XIX	Tét. D 95	OG	5 avril 1911	0,1	1 <sup>re</sup> humeur aqueuse normale Exp. témoin et exp. XVII.	1 5 10 25 50	Cobaye. — — — — —	0 0 0 + 3 j.	2,5 2,5 2,5 2,5	10.000
Exp. XX	Tét. D 98	OG	5 avril 1911	0,1	1 <sup>re</sup> humeur aqueuse normale exp. témoin et exp. XVI.	1 3 10 25 50	Cobaye. — — — — —	+ 5 j. + 5 j. + 3 j. + 3 j. + 2 j.	Inférieur à 0,1 4.000	
»	Témoins.		»	—	—	3 5 10 1 3	Cobaye. — — — Souris. —	+ 5 j. + 3 j. + 4 j. + 5 j. + 2 j.	» » » » »	

Alors que le titre de l'humeur aqueuse atteignait 20 lors de la deuxième ponction (trente minutes après la première), il est encore de 5, cinq jours après, et alors que l'humeur aqueuse de l'œil gauche, prise comme témoin le même jour (exp. XIX), n'indique qu'un titre de 2,5.

Nous ne voulons cependant pas donner à ces chiffres une valeur trop absolue, d'autant que le titre du sérum a subi des variations et que nous voyons ce titre passer de 10.000 à 100.000 entre le moment où ont été faites les première, deuxième et troisième ponctions et celui où nous avons pratiqué la quatrième.

On a prétendu que la teneur de l'humeur aqueuse en anticorps pouvait subir des variations importantes sous l'influence de causes irritatives s'exerçant sur les membranes externes du globe. On a attribué notamment un rôle important aux injections sous-conjonctivales hypertoniques et même aux injections d'eau salée physiologique.

Miyashita injectait sous la conjonctive du lapin une solution chaude de chlorure de sodium à 0,85 p. 100 (0 c. c. 5). Il constatait une augmentation des hémolysines après injection d'air chaud ou d'eau salée.

Les expériences XXII et XXIII montrent l'action de l'injection sous-conjonctivale de doses élevées de solution de chlorure de sodium hypertonique.

L'humeur aqueuse de l'œil gauche du cheval D 57 est celle d'un œil normal chez un animal immunisé, mais dont le titre en anticorps n'est pas très élevé puisque 0 c. c. 2 ne neutralise pas 3 doses mortelles et que les souris qui reçoivent le mélange d'humeur aqueuse + toxine meurent dans des conditions sensiblement égales à celles qui ne reçoivent que de la toxine. Il en est absolument de même de l'humeur aqueuse de l'œil droit de ce même cheval qui avait reçu trente minutes avant la ponction une injection de 2 centimètres cubes de solution salée à 6 p. 100; le résultat est le même chez le cheval D 50 qui reçut sous la conjonctive 2 centimètres cubes d'une solution de NaCl à 0,8 p. 100.

Ces quelques expériences nous semblent indiquer que les injections sous-conjonctivales d'eau salée ne provoquent aucune modification dans la teneur en antitoxine de l'humeur aqueuse.

TABLEAU IV. — Expériences sur l'antitoxine tétanique. Effets des injections sous-conjonctivales.

NUMÉRO de l'expérience.	DÉSIGNATION du cheval.	DATE de l'expérience.	NATURE de l'injection.	QUANTITÉ de l'humeur aqueuse.	QUANTITÉ de toxine injectée.	ANIMAL réactif.	RÉSULTATS	TIRE de l'humeur aqueuse.	TIRE du sérum.
Exp. XXI	Tét. D 57 OG.	12 avril 1911	—	0,2	3 5 10 25 50	Souris. — — — —	+ 1 j. 1/2 + 2 j. + 1 j. 1/2 + 4 j. 1/2 + 1 j. 1/2	Inférieur à 0,05	100.000
Exp. XXII	Tét. D 57 OD.	12 avril 1911	Injection sous-conj. de 2 c. c. sol. de NaCl à 6,0 30 min. av. ponct.	0,2	3 5 10 25 50	Souris. — — — —	+ 3 jours. + 2 j. 1/2 + 1 j. 1/2 + 1 j. 1/2 + 1 jour.	»	»
Exp. XXIII	Tét. D 50 OD.	12 avril 1911	Injection sous conj. de 1 c. c. sol. NaCl à 0,8 9,0 30 min. av. ponct.	0,2	3 5 10 25 50	Souris. — — — —	+ 2 j. 1/2 + 1 j. 1/2 + 1 j. 1/2 + 1 j. 1/2	Inférieur à 0,05	50.000
»	Témoin.	»	—	—	3 5 10	Souris. — —	+ 3 jours. + 2 j. 1/2 + 1 jour.	»	»

L'expérience III faite avec l'antitoxine diphtérique nous avait conduit à un résultat identique.

Il y aura lieu, sans doute, de poursuivre ces expériences en faisant varier la nature des irritations péri-oculaires.

#### CONCLUSIONS.

Chez un animal fortement immunisé et dans les conditions physiologiques, il est toujours possible de déceler la présence d'antitoxine dans l'humeur aqueuse, mais la proportion de cet anticorps étant excessivement faible par rapport à la proportion contenue dans le sérum de ces mêmes animaux, il est nécessaire de recourir à des méthodes très sensibles. L'antitoxine téta-nique convient tout particulièrement à cette démonstration, et nous avons pu établir que le titre de l'humeur aqueuse variait de 0,1 à 1,25 chez des chevaux immunisés pour la toxine téta-nique dont le titre antitoxique du sérum variait de 1.000 à 100.000.

Le titre en antitoxine de l'humeur aqueuse n'est pas rigou-reusement proportionnel au titre en antitoxine du sérum.

Ainsi que cela a déjà été établi pour d'autres anticorps, agglutinines, précipitines, hémolysines, l'humeur aqueuse de deuxième ponction (qui contient toujours de fortes proportions d'albumine) peut renfermer des proportions 100 fois plus considérables d'antitoxines. Cette augmentation du titre anti-toxique de l'humeur aqueuse va en diminuant à partir de la deuxième ponction, et l'humeur aqueuse reprend peu à peu son titre normal par résorption de l'antitoxine; néanmoins, après trois semaines, il est encore possible d'en mettre en évidence des proportions plus grandes que dans l'humeur aqueuse de première ponction. Il semble donc que le renouvellement de l'humeur aqueuse soit infiniment plus lent qu'on ne l'a sou-tenu ou que de faibles altérations créées par une première évacuation de l'humeur aqueuse persistent assez longtemps en modifiant les conditions normales de sécrétion de ce liquide.

L'injection sous-conjonctivale d'eau salée faite une demi-heure avant la ponction de la chambre antérieure n'a pas modifié la teneur en antitoxine de l'humeur aqueuse.

# RECHERCHES SUR LA PRÉSENCE DES ANTICORPS DANS L'HUMEUR AQUEUSE DES ANIMAUX IMMUNISÉS

(BACILLE TYPHIQUE, VIBRION CHOLÉRIQUE)

par Y. MANOUÉLIAN

(Travail des laboratoires de MM. Metchnikoff et Morax.)

Parmi les nombreux travaux auxquels a donné lieu la recherche des anticorps dans l'humeur aqueuse des animaux immunisés, quelques-uns ont eu déjà pour objet la mise en évidence des anticorps produits par les bacilles typhiques ou le vibrion cholérique.

Nous signalerons entre autres le travail de A. Leber paru dans les *Archiv für Ophthalmologie* en 1906. Ses recherches ont été faites sur le lapin et l'immunisation a été réalisée par injection sous-cutanée ou sous-conjonctivale de cultures de bacilles typhiques et de vibrions cholériques.

D'après Leber, la recherche des agglutinines dans l'humeur aqueuse normale a toujours été négative. Ainsi, avec un titre de 1 p. 5, il ne s'est jamais produit d'agglutination pour le bacille typhique et le vibrion cholérique. Chez les animaux immunisés, le titre d'agglutination était toujours faible et oscillait entre 1 p. 10 et 1 p. 20; dans un cas de choléra il a atteint 1 p. 40.

Leber fait remarquer que l'injection sous-conjonctivale d'eau salée augmente nettement, après une demi-heure, le titre d'agglutination; il serait doublé ou décuplé.

Néanmoins le titre de l'humeur aqueuse est toujours inférieur à celui du sérum: alors que le sérum agglutinait à 1 p. 1000, l'humeur aqueuse n'agglutinait qu'à 1 p. 5 chez un lapin, à 1 p. 20 chez un autre.

Leber a cherché également les agglutinines contenues dans l'humeur aqueuse de lapins qui avaient reçu une injection sous-cutanée de sérum anticholérique. L'activité de l'humeur atteignait 1 p. 5 après une demi-heure et n'avait pas augmenté après vingt-quatre heures.

D'autre part, Leber a utilisé le phénomène de Pfeiffer pour étudier le pouvoir bactéricide de l'humeur aqueuse.

L'humeur aqueuse était additionnée de bouillon de façon à obtenir 1 centimètre cube en tout. On ajoute 1 demi-centimètre cube d'une émulsion de bacilles ou de vibrions en bouillon et on introduit le mélange dans la cavité péritonéale du cobaye. Après une heure, on ponctionne le contenu de la cavité abdominale et l'on examine.

Leber a constaté qu'avec l'humeur aqueuse normale on n'obtenait pas le phénomène de Pfeiffer, et les cobayes mourraient fréquemment. Avec l'humeur aqueuse des animaux contre le choléra et le typhus, on obtenait nettement le phénomène de Pfeiffer et les cobayes survivaient.

Il nous a semblé intéressant de contrôler ces résultats et de les compléter par les méthodes de la fixation du complément et des précipitines.

Les recherches que nous relatons dans ce travail ont trait au bacille typhique et au vibrion cholérique.

Pour exécuter ces recherches, nous nous sommes adressé : 1<sup>o</sup> à la méthode de la fixation du complément de Bordet-Gengou ; 2<sup>o</sup> aux agglutinines ; 3<sup>o</sup> aux précipitines.

Pour l'immunisation de nos lapins, nous avons employé des cultures sur gélose de vingt-quatre heures dans des tubes de 17 centimètres. Nous avons fait une émulsion dans 10 centimètres cubes d'eau physiologique et injecté dans les veines auriculaires. Au début de l'immunisation, nous avons chauffé nos émulsions à 60 degrés ; plus tard, nous avons inoculé des microbes vivants. Pour toutes nos réactions, l'humeur aqueuse et le sérum des animaux traités, ainsi que ceux des lapins neufs étaient inactivés par chauffage à 56 degrés pendant une demi-heure. Les émulsions de microbes étaient également chauffés à 60 degrés pendant une heure. Rarement, nous avons employé des microbes vivants.

Chez les lapins traités, nous avons procédé, ordinairement une semaine après la dernière injection, à la saignée et au prélèvement de l'humeur aqueuse. Nous avons répété quelquefois ces prélèvements, mais en ayant soin de laisser entre eux un temps qui n'a jamais été inférieur à deux ou trois jours.

\* \*

## RECHERCHES PAR LA MÉTHODE DE BORDET-GENGOU.

Comme antigène, nous nous sommes servi des cultures en gélose âgées de vingt-quatre heures. Pour les bacilles typhiques, il nous a suffi de délayer des cultures provenant de tubes de 17 centimètres dans 15 centimètres cubes d'eau physiologique. Pour les vibrions cholériques, une pareille dilution était trop forte; nous avons dû employer 25 à 30 centimètres cubes d'eau physiologique. Ces émulsions étaient, nous le répétons, stérilisées par le chauffage à 60 degrés pendant une heure.

Au lieu de faire de longues descriptions, voici des tableaux qui fixeront mieux les idées.

Suivant la technique habituelle, les tubes contenant l'eau physiologique, l'antigène (A), le sérum ou l'humeur aqueuse (B) et l'alexine (C) sont portés à l'étuve à 37 degrés; après un séjour de une heure et demie, on ajoute le sérum hémolytique (D) et l'émulsion de globules rouges (E); après un nouveau séjour d'une demi-heure à l'étuve, la réaction est terminée: les tubes sont examinés et l'on constate la dissolution complète des globules (hémolyse complète), la dissolution partielle (hémolyse incomplète), ou l'absence de dissolution (pas d'hémolyse).

Le lapin qui a servi à l'expérience ci-dessus avait reçu, en trois semaines, 3 centimètres cubes d'émulsion au centième de bacilles typhiques chauffés; 1 centimètre cube par semaine. Depuis, ce lapin a reçu, dans l'espace de trois mois, 10 centimètres cubes d'émulsion chauffée et non diluée et 27 c. c. 1/2 d'émulsion de bacilles vivants. Or, après ce traitement, son sérum et son humeur aqueuse n'avaient pas acquis un pouvoir empêchant sensiblement supérieur à celui que nous avons relaté et qui avait été obtenu après trois semaines. Le sérum empêchait l'hémolyse à la dose de 0 c. c. 00005, et l'humeur aqueuse partiellement à la dose 0 c. c. 1; elle n'empêchait pas à 0 c. c. 05.

Un lot de 4 lapins a reçu, dans l'espace de trois mois, 4 centimètres cubes d'émulsion au centième chauffée, 8 centimètres cubes non diluée et chauffée, et 15 centimètres cubes d'émulsion de bacilles vivants.

N°	NUMÉROS DES TUBES		B ÉMULSION de bacilles chauffées à 60 degrés.	B SÉRUM DE LAPIN traité inactivé.	C SÉRUM DE COBAYE frais à 50 p. 100.	D SÉRUM HÉMOLYTIQUE de lapin inactivé.	E SANG DÉFIBRINÉ de mouton à 5 p. 100.	RÉSULTATS
	EAU PHYSIOLOGIQUE	c. c.						
1	1,6	0,2	—	0,2	0,1	0,1	1	Hémol. compl.
12	1,5	—	—	0,2	0,1	0,1	1	Hémol. compl.
3	1,6	0,1	—	0,2	0,1	0,1	1	Pas d'hémol.
4	1,6	0,1	—	0,1	0,1	0,1	1	Pas d'hémol.
5	1,2	0,4	—	0,03	0,1	0,1	1	Pas d'hémol.
6	1,6	0,1	—	0,01	0,1	0,1	1	Pas d'hémol.
7	1,2	0,1	—	0,005	0,1	0,1	1	Pas d'hémol.
8	1,6	0,1	—	0,001	0,1	0,1	1	Pas d'hémol.
9	1,2	0,1	—	0,0005	0,1	0,1	1	Pas d'hémol.
10	1,6	0,1	—	0,0001	0,1	0,1	1	Pas d'hémol.
11	1,2	0,1	—	0,00005	0,1	0,1	1	Hémol. compl.
12	1,6	0,1	—	0,00001	0,1	0,1	1	Hémol. compl.
Humeur aqueuse de lapin traité inactivé.								
13	1,2	0,1	—	0,5	0,1	0,1	1	Pas d'hémol.
14	1,2	0,1	—	0,05	0,1	0,1	1	Hémol. compl.
Sérum de lapin neuf inactivé.								
15	1,5	0,1	—	0,2	0,1	0,1	1	Hémol. compl.
16	1,6	—	—	0,2	0,1	0,1	1	Hémol. compl.
17	1,6	0,1	—	0,1	0,1	0,1	1	Hémol. compl.
18	1,2	0,1	—	0,05	0,1	0,1	1	Hémol. compl.
Humeur aqueuse de lapin neuf inactivé.								
19	1,2	0,1	—	0,5	0,1	0,1	1	Hémol. compl.
20	1,8	—	—	—	0,1	0,1	1	Hémol. compl.
21	2 "	—	—	—	—	—	1	Pas d'hémol.

Un autre lot avait reçu dans l'espace de quatre mois 4 centimètres cubes au centième chauffée, 8 centimètres cubes non diluée chauffée et 25 centimètres cubes de bacilles vivants. Enfin, un lapin a reçu dans l'espace de six mois 8 centimètres

cubes de culture stérilisée au centième et 115 centimètres cubes de microbes vivants.

Or, 15 expériences nous ont confirmé ce fait, qu'à partir d'un certain degré rapidement atteint, il n'y avait plus de progression dans le pouvoir empêchant du sérum et de l'humeur aqueuse. Ainsi, malgré la quantité considérable d'émulsion reçue, notre dernier lapin a fourni en dernier lieu un sérum qui fixait le complément à la dose de 0 c. c. 0001 et partiellement à 0 c. c. 00005.

Quant à l'humeur aqueuse, elle fixait à 0 c. c. 5, mais elle n'avait aucun pouvoir empêchant à 0 c. c. 4 et à 0 c. c. 05. Ces résultats étaient sensiblement analogues à ceux obtenus à quatre reprises au cours de l'immunisation de ce même animal.

Ceci étant dit, voyons quelle est la richesse comparative du sérum et de l'humeur aqueuse en anticorps. Or, chaque fois que le sérum a un pouvoir empêchant à la dose de 0 c. c. 0005 à 0 c. c. 0001, l'humeur aqueuse empêche à 0 c. c. 5, à 0 c. c. 45, elle n'empêche pas à 0 c. c. 25, à 0 c. c. 1, ou empêche très peu. Dans ce cas, le sérum empêche partiellement à 0 c. c. 00005. L'humeur aqueuse contient donc 1.000 à 5.000 fois moins d'anticorps que le sérum sanguin.

Ce que nous venons de dire à propos des lapins traités par des cultures typhiques, est absolument exact aussi pour les animaux inoculés avec les vibrions cholériques. Le tableau précédent peut servir parfaitement à cet effet.

Ainsi nous avons inoculé comme précédemment 3 centimètres cubes d'émulsion au centième de vibrions chauffés à 1 lapin : 1 centimètre cube par semaine. Après une semaine de la dernière injection, le sérum fixait le complément à 0 c. c. 0005 alors que l'humeur aqueuse ne fixait pas du tout à 0 c. c. 25. Depuis, ce lapin a reçu des doses considérables de culture : 15 centimètres cubes de culture chauffée et non diluée et 29 centimètres cubes de microbes vivants dans l'espace de quatre mois environ. Or, au cours de l'immunisation, nous avons fait à trois reprises la réaction de Bordet-Gengou, et nous avons constaté que le pouvoir du sérum était sensiblement le même. L'humeur aqueuse fixait à 0 c. c. 5.

Nous avons inoculé à un lot de 4 lapins 4 centimètres cubes d'émulsion au centième, 6 centimètres cubes de vibrios chauffés et non dilués, et 10 centimètres cubes de microbes vivants, dans l'espace de trois mois. A un autre lot de 4 lapins, nous avons inoculé 4 centimètres cubes d'émulsion au centième, 6 centimètres cubes de microbes chauffés et 25 centimètres cubes de vibrios vivants, dans l'espace de quatre mois. Un autre lapin a reçu en six mois 7 centimètres cubes d'émulsion au centième 10 centimètres cubes de vibrios chauffés et 100 centimètres cubes de microbes vivants. Or, au cours de l'immunisation, nous avons fait la réaction à cinq reprises et nous avons constaté que le sérum fixait totalement le complément à 0 c. c. 0001 et partiellement à 0 c. c. 00005. L'humeur aqueuse fixait totalement à 0 c. c. 5 et à 0 c. c. 4 et quelquefois partiellement à 0 c. c. 1. Résultat analogue à celui que nous avons obtenu avec nos lots de lapins dans un certain nombre d'expériences. En tout, 16 expériences nous autorisent d'affirmer.

\* \* \*

#### RECHERCHES SUR LES AGGLUTININES ET LES PRÉCIPITINES TYPHIQUES ET CHOLÉRIQUES.

Nous avons fait huit expériences avec des immuns-sérum typhiques et huit autres avec des immuns-sérum cholériques. Constamment, les premiers possédaient un pouvoir agglutinant plus fort que les seconds. Notre tableau d'agglutination est celui d'un sérum obtenu par des bacilles typhiques. Les sérums cholériques n'agglutinent bien qu'à 0 c. c. 001. Ici aussi nous avons les mêmes résultats quant à la force agglutinatrice : au bout de quelques injections, le sérum acquiert des propriétés nouvelles qui atteignent rapidement un maximum, qu'il est impossible de dépasser, malgré de fortes charges en microbes. Veut-on des exemples ? Il n'y a qu'à regarder ce que nous avons dit dans le chapitre précédent à propos de la réaction Bordet-Gengou. Les choses se passent absolument de la même façon.

Voici notre tableau d'expérience pour les agglutinines :

N <sup>o</sup> s des tubes.	EAU physio- logique.	SÉRUM de lapin traité inactivé.	ÉMULSION de microbes chauffée.	RÉSULTAT APRÈS 2 HEURES de séjour à l'étuve à 37 degrés.
	cent. cubes.	cent. cubes.	cent. cubes.	
1	0,5	—	1	Pas d'agglutination.
2	—	0,5	1	Agglutination.
3	0,4	0,04	1	Agglutination.
4	—	0,003	1	Agglutination.
5	0,4	0,001	1	Agglutination.
6	—	0,0005	1	Agglutination.
7	0,4	0,0001	1	Agglutination.
8	—	0,00005	1	Agglutination légère.
9	0,4	0,00001	1	Agglutination légère.
		Humeur aqueuse de lapin traité inactivé.		
10	—	0,5	1	Agglutination.
11	0,4	0,4	1	Agglutination légère.
		Sérum de lapin neut inactivé.		
12	—	0,5	1	Pas d'agglutination.
13	0,4	0,4	1	Pas d'agglutination.
		Humeur aqueuse de lapin neut inactivé.		
14	—	0,5	1	Pas d'agglutination.

Pour ce qui est des précipitines, nous avons fait aussi cinq expériences avec des immuns-sérum typhiques et cinq autres avec des immuns-sérum cholériques. Mêmes considérations que précédemment et même conclusion en ce qui concerne la richesse des précipitines de sérum et de l'humeur aqueuse.

Pour nos recherches sur les précipitines, nous avons employé des cultures de vibrions cholériques et de bacilles typhiques en bouillon peptoné âgées de dix jours. Nous avons filtré ces cultures à travers une bougie Chamberland F. Voici un tableau :

N <sup>o</sup> s des tubes.	EAU physio- logique.	SÉRUM de lapin traité inactivé.	FILTRAT	RÉSULTAT après 3 heures de séjour à l'étuve.
cent. cubes.	cent. cubes.	cent. cubes.	cent. cubes.	
1	0,5	—	1	Pas de précipité.
2	0,3	0,2	1	Précipité.
3	0,4	0,1	1	Précipité.
4	—	0,05	1	Précipité.
5	0,4	0,01	1	Léger précipité.
6	—	0,005	1	Léger précipité.
7	0,4	0,001	1	Pas de précipité.
<hr/>				
		Humeur aqueuse de lapin traité inactivé.		
8	—	0,5	1	Très léger précipité.
9	0,4	0,1	1	Pas de précipité.
<hr/>				
		Sérum de lapin neuf inactivé.		
10	0,3	0,2	1	Pas de précipité.
11	0,4	0,1	1	Pas de précipité.
12	—	0,05	1	Pas de précipité.
<hr/>				
		Humeur aqueuse de lapin neuf inactivé.		
13	—	0,5	1	Pas de précipité.

## CONCLUSIONS.

Il résulte des expériences précédentes :

Que chez les animaux immunisés, on peut mettre en évidence, par la méthode de la fixation du complément, la présence d'anticorps dans l'humeur aqueuse, et par les procédés spéciaux, celle des agglutinines et précipitines.

Pour toutes ces substances, le rapport entre les quantités contenues dans le sérum et celles contenues dans l'humeur est de 1 à 5.000; 1, représentant la quantité contenue dans l'humeur aqueuse.

**RECHERCHES**  
**SUR LA PRÉTENDUE ACTION BACTÉRICIDE**  
**DE L'HUMEUR AQUEUSE**  
**A L'ÉGARD DE LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE**

par Y. MANOUÉLIAN

Nuttall (1), dans ses expériences sur les actions bactéricides des humeurs de l'organisme, a étudié l'action de l'humeur aqueuse normale du lapin sur la bactéridie charbonneuse virulente. Il a fait des examens en goutte pendante et des numérations de colonies après ensemencement d'un mélange de bactéridies et d'humeur aqueuse.

Toutes ses expériences montrent une action nettement bactéricide se traduisant soit par un processus de dégénération, soit par un arrêt de développement se manifestant déjà après une heure de contact.

Buchner (2) arrive à des résultats analogues en faisant agir l'humeur aqueuse normale du chien et du lapin sur du bacille typhique.

Les conclusions de ces auteurs ont été admises sans que, pour la bactéridie charbonneuse au moins, elles aient été soumises à une vérification expérimentale.

Il nous a donc paru utile de reprendre ces recherches.

Si l'humeur aqueuse normale est réellement bactéricide pour la bactéridie charbonneuse, on doit pouvoir exagérer cette action. et, chez un animal fortement immunisé, l'humeur aqueuse doit acquérir un véritable pouvoir empêchant.

Pour le vérifier, nous avons injecté à un mouton hyperimmunisé 0 gr. 50 de culture de charbon virulent et sporogène sur gélose âgée de vingt-quatre heures; cette culture était émul-

(1) NUTTALL, Experimente ueber die bakterienfeindlichen Einflüsse der Thierschen körpers. *Zeitschrift f. Hygiene*, 1888, vol. IV, p. 353.

(2) BUCHNER, Untersuchungen ueber die bakterienfeindlichen Wirkungen des Blutes und Blutserums. *Arch. f. Hygiene*, 1890, vol. X, p. 94.

sionnée dans de l'eau physiologique. Au bout de trois semaines, nous avons prélevé l'humeur aqueuse. Nous avons fait un second prélèvement dans des conditions identiques.

Voici notre tableau d'expériences :

DILUTION D'UNE GOUTTE de culture de charbon aspergène virulente sur bouillon-pept. sur 48 heures dans 5 c. c. de bouillon pept.	BOUILLON-PEPT. ou humeur aqueuse.		PREMIÈRE EXPÉRIENCE	DEUXIÈME EXPÉRIENCE avec un nouveau prélèvement d'humeurs aqueuses nombre de colonies après 36 heures d'étuve.
			nombre de colonies après 36 heures d'étuve.	
1 goutte.	3 gouttes.	On ensemence immédiatement le mélange dans de la gélose à 1 1/2 p. 100 et on fait 3 boîtes de Petri.	147 ▲	150
1 goutte.	Bouillon-pept. 3 gouttes.	Après 2 heures de contact, on ensemence le mélange dans de la gélose à 1 1/2 p. 100 et on fait 3 boîtes de Petri.	165	160
1 goutte.	Humeur aqueuse de lapin neuf. 3 gouttes.	<i>Idem.</i>	150	142
1 goutte.	Humeur aqueuse de mouton neuf. 3 gouttes.	<i>Idem.</i>	134	139
1 goutte.	Humeur aqueuse de mouton hypervacciné. 3 gouttes.	<i>Idem.</i>	132	142

Il résulte de ces expériences que l'humeur aqueuse du lapin et du mouton neufs, ainsi que celle du mouton hypervacciné ne possèdent aucune action bactéricide contre la bactéridie charbonneuse.









## TRYPANOSOMES DES BATRACIENS DU TONKIN

par C. MATHIS et M. LEGER

(avec les planches V et VI)

(Travail des Laboratoires d'Hanoï et de M. Mesnil.)

Dans le cours de ces trois dernières années, nous avons examiné au Tonkin le sang d'un grand nombre de batraciens, environ 1.500.

Les grenouilles appartiennent aux espèces : *Rana tigrina* Daudin, *Rana limnocharis* Wiegmann, *Rana Guntheri* Blgr., *Rhacophorus leucomystax* Gravenhorst, var. *quadrilineata* et *Microhyla pulchra* Hallao ; les crapauds à l'espèce *Bufo melanostictus* Schneider.

Ces deux genres de batraciens (1) possédaient des parasites distincts que nous décrirons successivement.

### TRYPANOSOMES DES GRENOUILLES

Laveran et Mesnil (2) ont réuni sous le nom de *Trypanosoma rotatorium* Mayer les formes extrêmement variées de trypanosomes rencontrées chez les grenouilles d'Europe. Ils ont décrit des formes plissées, à surface couverte de nombreuses côtes, et des formes aplatis à surface lisse. Entre ces deux variétés, ils ont montré qu'il existait toutes les formes intermédiaires. Laveran et Mesnil insistent sur ce fait que tous ces parasites ont la même structure chromatique.

En 1907, França et Athias (3), examinant les grenouilles du

(1) Nous sommes redevables de la détermination de nos grenouilles et de nos crapauds à M. R. Despax, préparateur au Muséum, laboratoire de M. le professeur Roule. Nous le remercions vivement de sa grande obligeance.

(2) LAVERAN et MESNIL, Trypanosomes et trypanosomiases, pp. 365 à 376, 1904. Masson et Cie, Paris.

(3) FRANÇA et ATHIAS, Arch. Inst. bacter. Camara Pestana, 1906, vol. I, f. 1, pp. 127-165.

Portugal, *Rana esculenta*, arrivèrent à considérer comme deux espèces distinctes les deux variétés principales de Laveran et Mesnil. Ils désignèrent sous le nom de *Tryp. loricatum vel costatum* les formes présentant des stries spiralées et à noyau sphérique, réservant le nom de *Tryp. rotatorium* (*sensu stricto*) au type dépourvu de stries, à blépharoplaste situé très près de l'extrémité postérieure et dont le noyau, de forme elliptique, de 5  $\mu$  sur 3  $\mu$ , est « rarement visible ».

Peu de temps après, les mêmes auteurs (1) décrivirent chez *Hyla arborea* un parasite qu'ils rapportèrent d'abord à leur type *rotatorium*, mais dont ils firent ensuite une espèce distincte sous le nom de *Tryp. hylæ*. Ce trypanosome est caractérisé par un noyau en fuseau très allongé (15 à 19  $\mu$  de long, sur 1  $\mu$  5 à 3  $\mu$  de large) et par un blépharoplaste situé à 1  $\mu$  5 en arrière du noyau.

Antérieurement à la note dans laquelle França (2) adopte pour le flagellé de *Hyla arborea* le nom de *Tryp. hylæ*, Marchoux et Salimbeni (3) décrivirent chez une *Hyla sp.* (?) du Brésil un trypanosome possédant également « un noyau en forme de fuseau allongé, recourbé en arc, et très peu chromophile », qu'ils dénommèrent *Tryp. Borreli*.

A notre avis, le *Tryp. hylæ* et le trypanosome des grenouilles, appelé *rotatorium* par França et Athias, sont identiques. Chez ce dernier parasite, les auteurs portugais n'ont pas obtenu une coloration suffisante du noyau. Seules, les masses de chromatine condensée qu'ils signalent chez *Tryp. hylæ* auraient retenu le colorant. C'est la conviction à laquelle nous avons amenés l'examen des figures de la planche IV de leur travail.

*Tryp. hylæ* tombe donc en synonymie avec *Tryp. rotatorium* au sens França et Athias; mais le terme de *Tryp. rotatorium* étant réservé pour les formes décrites chez les grenouilles d'Europe par Laveran et Mesnil, il convient, suivant les règles de la nomenclature, d'adopter pour le trypanosome à noyau en fuseau arqué le nom de *Trypanosoma Borreli*.

(1) FRANÇA et ATHIAS, *Arch. Inst. bacter. Camara Pestana*, 1907, t. I, f. II, pp. 289-309.

(2) FRANÇA, *Arch. Inst. bacter. Camara Pestana*.

(3) MARCHOUX et SALIMBENI, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1907, t. LXII, p. 592.

Au Tonkin, les trypanosomes que nous avons rencontrés chez les grenouilles appartiennent à deux espèces distinctes. La première est identique à *Tryp. rotatorium* Mayer, avec ses deux variétés pectinée et lisse, ayant toutes deux des noyaux sphériques; la seconde, à noyau fusiforme, se rattache à *Tryp. Borreli*. Signalons que nous avons observé très exceptionnellement un trypanosome du type *Tryp. elegans* (pl. V, fig. 8).

1<sup>o</sup> **TRYPANOSOMA ROTATORIUM.** — Ce flagellé, très fréquent chez les grenouilles d'Europe, et dont l'étude complète a été faite par Laveran et Mesnil, a été rencontré au Tonkin chez *Rana tigrina*, *R. limnocharis* et *R. Guntheri* dans une forte proportion.

La variété à côtes se présente sous deux aspects différents suivant que le trypanosome est vu de face ou de profil.

Dans le premier cas (pl. V, fig. 1 et 3), il a une forme lancéolée avec l'extrémité antérieure plus étroite que la postérieure. La surface du corps est parcourue par des stries longitudinales qui viennent converger aux deux extrémités du parasite. Par le Giemsa ou le Leishman, le protoplasme se teinte fortement en bleu violacé, les stries demeurant incolores. Le noyau, généralement central, sphérique, a un diamètre de 4  $\mu$ . Le blépharoplaste se présente comme un grain sphérique lilas foncé situé à environ 6  $\mu$  en arrière du noyau. Le flagelle, qui naît dans le voisinage du blépharoplaste, borde une membrane ondulante très irrégulièrement plissée; sa portion libre est toujours très courte.

Le parasite vu de profil (pl. V, fig. 2), ovoïde, montre un bord convexe longé sur les deux tiers environ de sa longueur par la membrane ondulante et un bord légèrement concave; le noyau est toujours plus rapproché du bord convexe que du bord concave.

Les dimensions du corps sont assez variables, suivant que le parasite est plus ou moins aplati. Il mesure en moyenne 40  $\mu$  de longueur, avec une largeur maxima de 30  $\mu$ .

Les trypanosomes appartenant à la variété *aplatie à surface lisse* (pl. V, fig. 7) sont beaucoup plus rares chez les grenouilles. Dans le type le plus différencié, le corps a la forme d'un arc plus ou moins recourbé, avec deux extrémités effilées. La

membrane ondulante, régulièrement plissée, suit le bord convexe du parasite et se termine par un flagelle libre beaucoup plus long que dans la variété pectinée. Le noyau sphérique est plus rapproché de l'extrémité postérieure que de l'antérieure. Le blépharoplaste est dans son voisinage immédiat.

Cette forme aplatie se rattache à la forme pectinée par une série d'intermédiaires présentant tous un appareil nucléaire identique.

A côté des formes que nous venons de décrire, on voit dans le sang, même fraîchement sorti des vaisseaux, des parasites plus ou moins ovalaires (pl. V, fig. 4, 5 et 6) ayant perdu leur membrane ondulante et dont le blépharoplaste est soit intra, soit juxta-nucléaire. Ces éléments, chez lesquels ne subsistent qu'un vestige de flagelle, mesurent en moyenne 28  $\mu$  sur 20  $\mu$ . Ils représentent des stades de multiplication.

**2<sup>o</sup> TRYPANOSOME A NOYAU FUSIFORME.** — Ce parasite (pl. V, fig. 9 à 14) a été observé chez *Rana tigrina*, *R. limnocharis* et *R. Guntheri*; nous ne l'avons pas vu chez le petit nombre de rainettes *Microhyla pulchra* que nous avons examinées. Il peut être associé à *Tryp. rotatorium* ou exister à l'exclusion de tout autre trypanosome.

Le corps est aplati, allongé, plus ou moins recourbé en arc, avec un bord externe longé par la membrane ondulante et un bord interne concave. L'extrémité postérieure est mousse; l'antérieure s'effile et accompagne le flagelle sur une petite distance. Par le Giemsa ou le Leishman, la masse du corps prend une teinte bleu violacé, tandis que l'ectoplasme de la membrane bordante se colore en rose clair. Le noyau, caractéristique, a la forme d'un fuseau très allongé et légèrement arqué, disposé suivant l'axe longitudinal du parasite; sa longueur atteint de 11 à 17  $\mu$  avec une largeur maxima de 2  $\mu$  à 2  $\mu$  5; l'extrémité antérieure se termine en pointe, la postérieure est arrondie. Le noyau ne se colore pas uniformément: sur un fond rose pâle, on distingue des masses de chromatine condensée occupant des positions variables dans le fuseau. Le blépharoplaste, ellipsoïdal, est dans le voisinage immédiat du noyau; quelquefois, il lui est nettement accolé. Le flagelle prend naissance dans une petite zone claire non loin du blépharo-

plaste; il borde une membrane ondulante à plis larges et profonds, au nombre de 8 à 9, contourne l'extrémité antérieure du parasite et devient libre sur un trajet de 15 à 22  $\mu$  environ.

Les dimensions du trypanosome à noyau fusiforme des grenouilles du Tonkin sont les suivantes :

De l'extrémité postérieure au centrosome . . . . .	4 $\mu$ 5 à 5 $\mu$ "
Du centrosome au noyau . . . . .	0 $\mu$ 5 à 1 $\mu$ 3
Longueur du noyau . . . . .	11 $\mu$ " à 16 $\mu$ "
Du noyau à l'extrémité antérieure . . . . .	12 $\mu$ " à 16 $\mu$ "
Longueur moyenne du corps . . . . .	30 $\mu$ "
Flagelle libre . . . . .	15 à 22 $\mu$
Largeur maxima du corps . . . . .	12 à 15 $\mu$

Dans la circulation périphérique, il existe, à côté des éléments flagellés, des parasites (pl. V, fig. 15 à 21), se préparant à la multiplication. Ils ont pris une forme plus ou moins ovale, le noyau s'est arrondi et le blépharoplaste est devenu intra-nucléaire; la membrane ondulante a disparu et il ne subsiste qu'un vestige de flagelle. Ces formes en division ressemblent à celles des mêmes stades de *Tryp. rotatorium*, mais sont généralement de taille moindre.

Le trypanosome que nous venons de décrire chez *les grenouilles du Tonkin* n'ayant pas de caractères suffisants permettant de le séparer de *Trypanosoma Borreli* Marchoux et Salimbeni et de *Trypanosoma hylæ* França, nous ne nous croyons pas autorisés à le considérer comme une espèce nouvelle et nous adopterons pour le désigner le nom de *Trypanosoma Borreli*.

Ce parasite existe également chez les grenouilles de France; il avait passé jusqu'ici inaperçu. Nous avons tout récemment constaté sa présence en nombre extrêmement rare dans des frottis de sang que l'un de nous avait colorés en 1906.

#### TRYPANOSOMES DES CRAPAUDS

Les trypanosomes que nous avons rencontrés chez les crapauds du Tonkin, *Bufo melanostictus* Schneider se rapportent tous à deux types spécifiquement distincts et sans relation

aucune avec les différentes espèces de trypanosomes signalés jusqu'ici chez les grenouilles.

Dans le sang, l'un des trypanosomes est caractérisé par un long flagelle et un blépharoplaste toujours accolé au noyau; l'autre, dont le blépharoplaste est presque constamment intra-nucléaire, n'est pourvu que d'un rudiment de flagelle.

La proportion exacte des crapauds parasités est impossible à donner : l'infection est souvent excessivement légère et peut passer inaperçue. Nous indiquerons que sur un milieu de crapauds examinés, le quart environ a été trouvé parasité.

Dans la très grande majorité des cas, les animaux ne présentent qu'une infection unique par l'un ou l'autre des trypanosomes. La répartition des deux espèces est d'ailleurs très différente suivant les lieux de capture. Ainsi, à Hanoï, dans le voisinage de l'Institut antirabique, les crapauds étaient infectés presque uniquement par la forme à flagelle rudimentaire; au contraire, ceux des alentours de l'Institut vaccinogène, situé à 5 kilomètres de Hanoï, montraient surtout des trypanosomes à long flagelle.

**1<sup>o</sup> TRYPANOSOME A LONG FLAGELLE.** — A l'état vivant, ce trypanosome est doué d'une grande mobilité qui peut persister plus de soixante heures à la température du laboratoire (13 à 18 degrés).

Sur préparations colorées au Giemsa ou au Leishman, le corps fusiforme, plus ou moins recourbé sur lui-même, montre deux extrémités effilées : la postérieure se termine assez brusquement en pointe; l'antérieure, au contraire, s'atténue progressivement et accompagne le flagelle sur un long parcours (Pl. VI, fig. 14). Le cytoplasme granuleux et non vacuolaire comprend une zone endoplasmique formant le corps proprement dit et une zone ectoplasmique constituant la membrane ondulante. Le noyau sphérique est situé au niveau de la partie la plus large du parasite, plus rapproché de l'extrémité postérieure que de l'antérieure. Le blépharoplaste est toujours accolé au noyau, dans une position quelquefois postérieure, le plus souvent latérale. La membrane ondulante, large et à plis profonds, longe le bord convexe du parasite. Elle est accompagnée par un flagelle dont la partie libre est relativement très longue.

On trouve dans le sang des formes petites et des formes grandes reliées par une série d'intermédiaires.

	VARIÉTÉ <i>porva.</i>	VARIÉTÉ <i>magna.</i>
De l'extrémité postérieure au blépharoplaste . . . . .	7 $\mu$ »	15 $\mu$ 5
Du blépharoplaste au bord postérieur du noyau. . . . .	Accolés.	Accolés.
Du bord postérieur au bord antérieur du noyau . . . . .	2 $\mu$ 5	2 $\mu$ 5
Du bord ant. du noyau à l'extrémité antérieure. . . . .	21 $\mu$ »	29 $\mu$ 5
Longueur du corps proprement dit . . . . .	30 $\mu$ »	47 $\mu$ 3
Flagelle libre. . . . .	14 $\mu$ »	15 $\mu$ »
Longueur totale . . . . .	44 $\mu$ 5	63 $\mu$ »
Largeur du corps proprement dit. . . . .	2 $\mu$ 5	5 $\mu$ 3
Largeur (y compris la membrane ondulante). . . . .	4 $\mu$ 3	7 $\mu$ »

Nous avons cultivé avec la plus grande facilité ce trypanosome sur milieu Novy-Mac Neal chauffé.

Dès le quatrième jour après l'ensemencement, on trouve de nombreuses formes *Crithidia*. La culture s'enrichit de plus en plus et au bout d'un mois les parasites sont encore très nombreux et très mobiles.

Les formes culturales (pl. VI, fig. 46) ont des dimensions variables. Les unes mesurent 13  $\mu$  de long avec une largeur maxima de 2  $\mu$  6,; d'autres atteignent jusqu'à 24  $\mu$  de long sur 8  $\mu$  de large. Le protoplasma, par le Giemsa après fixation à l'acide osmique, présente souvent des vacuoles. Le noyau occupe une situation centrale; il mesure de 1  $\mu$  75 à 3  $\mu$  5 de diamètre. Le blépharoplaste est accolé au noyau dans une situation soit antérieure, soit latérale. Certaines formes présentent un rudiment de membrane ondulante. Toutes possèdent un très long flagelle mesurant environ 35  $\mu$ .

Les formes culturales de ce trypanosome des crapauds sont nettement distinctes de celles obtenues par Bouet (1) avec *Trypanosoma rotatorium* des grenouilles. Chez celles-ci, le flagelle, notamment, est beaucoup moins long. La longueur du corps (y compris le flagelle) n'est que de 25  $\mu$  au lieu de 43 à 59  $\mu$ .

Dans les frottis de foie de crapauds infectés uniquement par ce trypanosome, nous avons rencontré un parasite arrondi, de

(1) BOUET, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1906, t. XX, p. 564.

8  $\mu$  de diamètre, dont le blépharoplaste est juxta-nucléaire et chez lequel le flagelle est très réduit (pl. VI, fig. 15).

Le trypanosome à long flagelle du crapaud que nous venons de décrire a déjà été vu par plusieurs observateurs.

Dutton, Todd et Tobey (1) ont signalé dans le sang de *Bufo regularis* du Congo un trypanosome de 30 à 48  $\mu$  de longueur (flagelle compris) ayant un centrosome très voisin du noyau.

Balfour et Wenyon (2) ont figuré dans une des planches de leur rapport sur le fonctionnement du laboratoire de Khartoum, un trypanosome de *Bufo regularis* de 31  $\mu$  de longueur (flagelle compris), aux deux extrémités effilées et à centrosome juxta-nucléaire.

Bouet (3) dit avoir revu en Afrique Occidentale française, chez *Bufo regularis*, des formes rappelant celles décrites par Dutton, Todd et Tobey et celles figurées par Balfour et Wenyon ; il n'en a donné aucune description.

Tous ces auteurs ont rattaché ce trypanosome à *Trypanosoma rotatorium* des grenouilles.

Récemment, França (4) a retrouvé le même flagellé chez *Bufo regularis* de la Guinée portugaise et en a fait une espèce distincte sous le nom de *Trypanosoma Bocagei*.

Nous nous rangeons à l'avis du distingué protozoologiste portugais, et, pour nous, il n'est pas douteux que ce parasite doive être nettement séparé de *Trypanosoma rotatorium*. Il convient toutefois de distinguer deux variétés de *Trypanosoma Bocagei* : l'une, la variété *parva*, qui seule jusqu'ici a été décrite ou figurée ; l'autre, la variété *magna*, qui peut atteindre plus de 60  $\mu$  de longueur et que nous avons trouvée, concurremment avec la petite forme, chez *Bufo melanostictus* du Tonkin.

## 2<sup>o</sup> TRYPANOSOME A FLAGELLE RUDIMENTAIRE. — A l'état vivant, ce flagellé paraît immobile et se présente comme une masse

(1) DUTTON, TODD et TOBEY, *Ann. of trop. Med. and Parasit.*, vol. I, n° 3, 1907, p. 321.

(2) BALFOUR, 3<sup>e</sup> Report Wellcome Research Labor. Khartoum, 1908, p. 59 et pl. III.

(3) BOUET, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1909, t. LXVI, p. 609.

(4) FRANÇA, *Arch. Inst. bact. Camara Pestana*, 1910, t. III, f. II, p. 231 et pl. VI, fig. 5 et 6.

ovoïde, d'aspect clair, à bords irrégulièrement festonnés et plus ou moins repliés sur eux-mêmes. Malgré un examen prolongé de plusieurs heures, nous n'avons pu constater le moindre changement dans la forme du parasite, ni aucune modification nucléaire. Les mensurations nous ont donné comme moyennes de 31 à 38  $\mu$  pour la longueur et 22 à 16  $\mu$  pour la largeur.

Sur préparations colorées au Leishman ou au Giemsa après fixation à l'acide osmique, le corps volumineux, un peu étalé, peut atteindre 45  $\mu$  sur 37  $\mu$ ; il apparaît généralement comme une masse irrégulièrement arrondie ou polygonale à bords convexes ou concaves (Pl. VI, fig. 1, 2 et 3); sur les spécimens que l'étalement n'a pas trop déformés, le parasite est ovoïde et présente à l'une de ses extrémités une saillie en pointe (Pl. VI, fig. 4).

Le noyau, d'ordinaire central, offre une structure des plus intéressantes. Sphérique ou légèrement ovoïde, d'un diamètre moyen de 7  $\mu$  5, il se colore en rose à peu près uniformément dans toute son étendue, à l'exception d'une zone excentrique, toujours plus faiblement teintée.

Le blépharoplaste, toujours intra-nucléaire, est entouré d'un halo clair, plus ou moins apparent, d'où part un flagelle qui traverse le noyau et vient se terminer après un court trajet dans la masse protoplasmique.

En plus du blépharoplaste de couleur *lilas foncé*, le noyau contient dans son intérieur des grains chromatiques colorés en *rose*, de dimensions variables. La signification de ces sortes de nucléoles nous échappe. Tantôt on n'observe qu'un seul grain, soit nettement sphérique, soit fusiforme et vraisemblablement en voie de division. Tantôt il y a deux grains égaux ou inégaux. D'autres fois, on compte trois grains de grosseurs différentes et dont l'un peut être plus volumineux même que le blépharoplaste. Enfin on peut observer quatre grains disposés par paires, ou même cinq grains.

Nous n'avons pas réussi à cultiver ce flagellé malgré des essais répétés, alors que nous avons obtenu très facilement des cultures de *Tryp. rotatorium* et de *Tryp. Bocagei*.

Les frottis des reins montrent des formes en général plus petites que celles du sang périphérique (Pl. VI, fig. 9 à 13). Dans ces jeunes trypanosomes, le blépharoplaste n'est pas

encore intra-nucléaire comme dans les formes sanguines. On le voit accolé au noyau ou dans son voisinage immédiat, mais le flagelle se montre toujours intra-protoplasmique et sans portion libre.

En somme, il s'agit d'un flagellé dont l'appareil cinétique est en voie de régression, et qui s'écarte à tel point de la forme typique des trypanosomes qu'il serait peut-être utile de créer un nouveau genre. Il eût été d'un grand intérêt d'obtenir sa culture. Sa souche paraît être parmi les trypanosomes massifs des batraciens (*Tryp. rotatorium*, *Tryp. Borreli*) qui présentent dans leur cycle des formes à flagelle réduit, sans membrane ondulante et à blépharoplaste intra-nucléaire. França et Athias (1) ont signalé de telles formes dans le cycle du trypanosome de *Hyla arborea* et nous en avons observé d'identiques dans le cycle de *Tryp. rotatorium* et de *Tryp. Borreli* des *Grenouilles* du Tonkin. Il s'en distingue par le fait que, dans les formes sanguines, l'appareil cinétique, qui est toujours réduit, n'est jamais fonctionnel.

La présence constante du blépharoplaste dans le noyau des formes adultes est à rapprocher du cas des *Leucocytozoon* où il existe souvent un grain ayant l'aspect d'un blépharoplaste qui est tantôt intra-nucléaire, tantôt juxta-nucléaire.

Nous dédions ce nouveau parasite à M. Chatton et nous proposons de l'appeler *Trypanosoma Chattoni*, réserve étant faite de la question générique.

(1) FRANÇA et ATHIAS, *Arch. Inst. bacter. Camara Pestana*, 1907, t. I, f. II, pl. XVI.

## PLANCHE V

**Trypanosomes de Grenouilles.**

(Gross. = 1100 diam. environ.)

1 à 7 . . . . *Trypanosoma rotatorium*.  
 1 à 3 . . . . *Tryp. rotatorium*, variété à côtes, vu de face.  
 2 . . . . . *Tryp. rotatorium*, variété à côtes, vu de profil.  
 4 à 6 . . . . Formes de multiplication de *Tryp. rotatorium*.  
 7 . . . . . *Tryp. rotatorium*, variété lisse.  
 8 . . . . . *Trypanosoma elegans*.  
 9 à 20 . . . . *Trypanosoma Borreli*.  
 15 à 20 . . . . Formes en voie de multiplication du *Tryp. Borreli*.  
 20 . . . . . Forme à deux noyaux.

## PLANCHE VI

**Trypanosomes de Crapauds.**

(Gross. = 1100 diam. environ.)

1 à 13 . . . . *Trypanosoma Chattoni*.  
 1 à 4 . . . . Formes sanguines à blépharoplaste intranucléaire.  
 5 à 8 . . . . Divers aspects du noyau.  
 9 à 13 . . . . Formes en voie de développement dans les reins.  
 15 . . . . . *Trypanosoma Bocagei*.  
 16 . . . . . Forme trouvée dans les frottis du foie.  
 17 . . . . . Formes culturelles de *Tryp. Bocagei*.

## LA ZYMASE EST-ELLE UNE DIASTASE ?

par A. LEBEDEFF.

Après les recherches de E. et H. Buchner et Hahn (1) sur la zymase, on a envisagé celle-ci comme une diastase, quoique des doutes plus ou moins fondés n'aient pas cessé d'exister à ce sujet (2).

Après que Harden et Loung (3), inspirés par les recherches de Gabriel Bertrand sur les coenzymes, ont démontré l'existence d'une coenzyme de la zymase, la question s'est compliquée et il a fallu dégager le rôle que jouent dans la fermentation alcoolique la zymase et sa coenzyme.

Pour prouver que la zymase est une diastase, Buchner (4) l'a diluée de quatre volumes d'eau et il a montré que son action ne s'était presque pas affaiblie. Il est à remarquer cependant que cette expérience ne peut servir de preuve décisive, parce qu'on aurait obtenu le même résultat s'il se produisait entre la zymase et le sucre une réaction stœchiométrique.

Pour démontrer que la zymase est une diastase, c'est-à-dire un catalyseur, il faudrait montrer que les quantités d'acide carbonique et d'alcool produites, toutes choses égales, ne dépendent pas de la quantité de zymase dont la concentration peut influencer seulement la vitesse de la réaction, mais pas le résultat final, et que, à la fin de l'expérience, elle se retrouve semblable à ce qu'elle était au début, sans s'être altérée ou détruite (à condition bien entendu de rester dans certaines limites en dehors desquelles la plupart des diastases, étant des substances très instables, sont profondément modifiées). Une preuve plus décisive de ceci n'a été apportée que beaucoup

(1) ED. BUCHNER, H. BUCHNER und HAHN, *Die Zymasegärung*, 1903.

(2) JACQUES DUCLAUX, *La Chimie de la matière vivante*, 1910, p. 118.

(3) *Journ. Physiol.* XXXII, 1904; *Proc. Ch. Soc.*, XXI, 1905; *Proc. Roy. Soc.*, 77 et 78, 1906.

(4) *Loc. cit.*, p. 160.

plus tard, notamment par Buchner et Klatte (1) lorsqu'ils ont démontré qu'en ajoutant de la coenzyme au suc de levure fermenté, on peut stimuler son activité et faire fermenter de nouvelles quantités de sucre, mais le rôle de la coenzyme (2) n'était pas mis en lumière par les auteurs.

Je crois que les expériences que je vais décrire comblent cette lacune en démontrant que le processus de la fermentation alcoolique consiste dans l'enchaînement de réactions enzymatiques (catalytiques) et purement chimiques (stœchiométriques) et que ce sont les dernières qui déterminent le résultat final, la zymase ne jouant qu'un rôle purement passif.

Le suc de levure dont je me suis servi a été préparé d'après ma méthode (3) en faisant macérer la levure séchée (25 à 30 degrés) pendant deux heures avec trois volumes d'eau (4). Par ce procédé, on a un suc d'une extraordinaire activité que l'on n'avait pas pu obtenir jusqu'à présent et qui dépasse presque trois fois le pouvoir fermentatif ordinaire (1 gr.  $\text{CO}_2$  pour 8 grammes de sucre et 20 cent. cubes du suc) (5).

Exp. 1. — Dans sept petites fioles d'Erlenmeyer (à peu près 80 cent. cubes) (1-7) munies d'une soupape de fermentation de Meissl, on a mis 8 grammes de saccharose, 0,2 cent. cubes de toluène, 20, 10, 5, 4, 3, 2 et 1 cent. cube de sucre et dans l'ordre inverse 19, 18, 17, 16, 15, 10 cent. cubes d'eau de façon à ce que la quantité de liquide dans toutes les fioles soit égale à 20 cent. cubes. On les a laissé fermenter à vingt-cinq degrés au thermostat.

On voit (tabl. I) que l'activité du suc diminue rapidement avec la dilution, qu'au delà d'une certaine dilution, aucune fermentation ne se produit à cause de la coagulation des albuminoïdes (Phénomène de Ramsey). La dilution d'un volume d'eau est

(1) *Bioch. Zeits.*, VIII, 520, 1908.

(2) En parlant de la coenzyme de la zymase, j'entends par là l'acide phosphorique total sous forme soit organique, soit inorganique, parce que d'une part ces deux formes peuvent passer de l'une à l'autre et parce que, d'autre part, il n'est pas jusqu'à présent démontré que la fermentation alcoolique soit possible sans la présence d'acide phosphorique à l'état inorganique.

(3) *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, séances du 3 janvier et 24 avril, *Bull. Soc. Chim.*

(4) Je vais publier ici même dans une communication suivante les données détaillées sur le mode de préparation et les propriétés du suc obtenu par macération; en attendant, je crois utile de faire connaître dès à présent qu'on peut se procurer de la levure sèche, très active, préparée, d'après mes indications, chez M. Schroder à Munich (Landwehrstr., 45).

(5) *Loc. cit.*, p. 86.

favorable à la fermentation, mais ce fait s'explique aisément parce que la coagulation du suc non dilué, s'il est riche en matières albuminoïdes et très actif, commence déjà au bout de vingt-quatre heures, tandis que le suc dilué reste encore limpide. De fait, le suc non dilué a donné au bout de vingt-quatre heures 1,52 gramme de  $\text{CO}_2$ , le suc deux fois dilué n'en a donné que 0,53; d'autre part, sa fermentation était plus régulière et de plus grande durée.

TABLEAU I. — LA LEVURE DE MUNICH

(1) Pas de fermentation ; coagulation des albuminoïdes.

Exp. 2. — Ici, toutes autres choses égales, on a fait varier non seulement la concentration de la zymase, mais aussi parallèlement celle du sucre dans les mêmes proportions que dans les expériences précédentes.

TABLEAU II. — LA MÈME LEVURE

N° NOMBRES	C. C. PAR FIOLE		DILUTION	GRAMMES D'ACIDE CARBONIQUE PAR JOUR								DURÉE	QUANTITÉ totale de CO <sub>2</sub>	gr. CO <sub>2</sub> multipliés par le coefficient de la dilution.	REMARQUES
	de suc	d'eau		1	2	3	5	6	7	8					
1	20	1	1	1.44	0.64	0.26	0.19	0.04	0.00	»	6	2.54	2.54		
2	10	10	1/2	0.55	0.38	0.27	0.28	0.06	0.02	0.00	7	1.56	3.42		
3	5	15	1/4	0.17	0.10	0.06	0.02	0.00	....	....	5	0.35	1.40		
4	4	16	1/5	0.11	0.07	0.04	0.02	0.00	....	....	5	0.24	1.20		
5	3	17	1/7	0.60	0.04	0.01	0.00	....	....	....	3	0.11	0.77		
6	2	18	1/10	0.05	0.01	0.00	....	....	....	....	2	0.06	0.60		
7	4	19	1/20	0.01	0.00	....	....	....	....	....				coagulation.	

On a préparé pour cela une solution de 24 grammes de sucre dans 60 cent. cubes de suc; 8 grammes de saccharose augmentant après la solution le volume de liquide à peu près de 5 cent. cubes, on a dilué de manière à ce que le volume de liquide dans chaque fiole soit égal à 25 cent. cubes. Par ce moyen, il était possible d'obtenir des résultats tout à fait comparables à ceux de l'expérience précédente (Tabl. II).

En comparant les chiffres de cette expérience avec ceux de la précédente, on constate un fait qui peut, à première vue, sembler paradoxal, c'est-à-dire que le changement simultané de la concentration de la zymase et du sucre n'a presque pas modifié le résultat final, comme si la zymase n'était pas un agent catalytique, mais une substance qui entre en réaction directe avec le sucre.

EXP. 3. — Elle reproduit l'expérience analogue de Buchner (1). Le suc (10 cent. cubes) a été dilué successivement avec 10, 20, 30 et 40 cent. cubes d'eau en maintenant la concentration du sucre constante (32 p. 100).

TABLEAU III.

NOMBRES	ADDITION de l'eau	ADDITION du sucre.	DILUTION	GRAMMES DE L'ACIDE CARBONIQUE PAR JOUR									DURÉE	QUANTITÉ CO <sub>2</sub>	LES CHIFFRES de deux expériences de Buchner (pour 10 c. c. du suc).
				1	2	3	4	5	7	8	9				
1	»	4	1	0.63	0.35	0.55	0.06	0.02	0.00	»	»	5	1.23	0.99	0.99
2	10	8	2	0.56	0.32	0.31	0.20	0.11	0.42	0.04	0.00	8	1.66	1.15	0.97
3	20	12	3	0.53	0.26	0.49	0.11	0.05	0.01	»	»	7	1.45	—	—
4	30	16	4	0.28	0.20	0.11	0.01	0.00	»	»	»	4	0.61	0.93	0.82
5	40	20	5	0.25	0.16	0.07	0.00	»	»	»	»	3	0.48	0.80	0.54

Avec la dilution, l'activité de mon suc diminue plus vite que celle du suc de Buchner; cela signifie qu'un changement plus profond du milieu se produit, ce qui n'est pas étonnant, étant donné que mon suc est non seulement plus actif, mais en général beaucoup plus riche en résidu sec.

Le suc que j'ai employé pour les expériences précédentes en contenait 15,87 p. 100. S'il est plus riche en extrait sec, il est plutôt plus pauvre en matières albuminoïdes que le suc de broyage. Il est à remarquer que mon suc fermente en général deux fois plus longtemps que celui-ci, ce qui s'explique par ce

(1) *Loc. cit.*; p. 160.

fait, comme on le verra plus loin, qu'il contient beaucoup plus de coenzymes.

Si l'on tient compte de ce fait (changement de milieu avec la dilution) on pourrait croire, surtout en se basant sur les expériences de Buchner, que si la dilution n'est pas trop grande (la dilution exagérée diminue, comme on l'a vu plus haut, la stabilité de la solution colloïdale), la quantité de  $\text{CO}_2$  formée ne dépend, toutes autres choses égales, que de la quantité de zymase.

Ainsi, les expériences précédentes semblent permettre de conclure que la zymase n'est pas un enzyme, mais elles ont toutes le même défaut de ne pas tenir compte de la présence de la coenzyme, comme on le verra dans les expériences suivantes.

Exp. 4 a. — Pour cette expérience, on a employé la levure de Munich, mais reçue de M. Schroder un mois plus tard.

Le suc contenait 45, 46 p. 100 de résidu sec dont 4 p. 100 seulement étaient formés par des albuminoïdes coagulables; néanmoins, il était très actif. On a pris une certaine quantité de suc et on a ajouté du sucre de sorte qu'il en contienne 32 p. 100. De même on a pris de l'eau sucrée à 32 p. 100. Chaque fiole contenait 25 cent. cubes du suc pur, sucré, ou mélangé avec de l'eau sucrée de façon à ce que le volume total soit toujours de 25 cent. cubes et la concentration 32 p. 100. Il n'est pas besoin de répéter qu'on se servait pour toutes les expériences du toluène comme antiseptique. Les fioles 1, 2, 3, 4, 5 et 2<sup>1</sup>, 3<sup>1</sup>, 4<sup>1</sup>, 5<sup>1</sup> ont été mises simultanément dans le thermostat à 25 degrés.

TABLEAU IV.

N°	CENT. CUB. PAR FIOLE		DILUTION	GRAMMES DE $\text{CO}_2$ PAR JOUR									DURÉE	QUANTITÉ $\text{CO}_2$	GRAMMES $\text{CO}_2$ multipliés par le coeffic. de dilution.
	de suc.	d'eau.		1	2	3	4	6	7	8	9				
1	25	»	1	0.62	0.50	0.35	0.24	0.15	0.02	0.00	»	7	1.88		1.88
2	12.50	12.50	2	0.22	0.19	0.12	0.12	0.16	0.04	0.03	0.00	8	0.88		1.76
3	6.25	18.75	4	0.12	0.11	0.06	0.04	0.03	0.03	0.00	»	6	0.36		1.44
4	5.00	20.00	5	0.08	0.07	0.03	0.02	0.01	0.00	»	»	6	0.21		1.05
5	3.70	21.30	7	0.04	0.04	0.02	0.01	0.01	0.01	0.00	»	6	0.12		0.84

Exp. 4 b. — Au lieu d'eau, on a ajouté le même suc, mais bouilli : u bain-marie dans un flacon bouché (1), filtré, refroidi et additionné du sucre jusqu'à 32 p. 100.

(1) J'ai vérifié que le suc bouilli ne faisait pas fermenter le saccharose.

TABLEAU V.

N <sup>o</sup> N <sup>o</sup> N <sup>o</sup> N <sup>o</sup>	CENT. CUB. par fiole.		DILUTION	GRAMMES DE CO <sub>2</sub> PAR JOUR										DURÉE CO <sub>2</sub>	QUANTITÉ CO <sub>2</sub>		
	de suc	de suc bouilli		1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	13			
2 <sup>a</sup>	12.50	12.50	2	0.26	0.30	0.27	0.22	0.30	0.10	0.07	0.05	0.04	0.02	0.01	0.00	12	1.64
3 <sup>a</sup>	6.25	18.75	4	0.17	0.19	0.20	0.17	0.27	0.10	0.09	0.05	0.04	0.03	0.03	0.00	13	1.34
4 <sup>a</sup>	5.00	20.00	5	0.12	0.13	0.15	0.14	0.23	0.10	0.08	0.06	0.05	0.03	0.03	0.00	13	1.12
5 <sup>a</sup>	3.70	21.30	7	0.09	0.10	0.12	0.11	0.20	0.07	0.06	0.06	0.02	0.01	0.00	»	11	0.84

Cette expérience prouve que si l'on dilue avec du suc bouilli au lieu de l'eau, la fermentation devient plus régulière et plus longue, se rapprochant de la fermentation par la levure; la quantité d'acide carbonique augmente presque proportionnellement à la quantité de coenzyme ajoutée. En effet, les quantités totales d'acide carbonique multipliées par les coefficients de dilution (3, 4, 5 et 7) dans l'expérience 4 a) sont presque égales à celles de l'expérience 4 b) non multipliées par les coefficients correspondants :

$$\begin{array}{llll}
 4 \text{ a} \dots & 1,76 & 1,44 & 1,05 \\
 4 \text{ b} \dots & 1,64 & 1,34 & 1,12
 \end{array}
 \quad \begin{array}{l}
 \text{0.84 grammes.} \\
 \text{0.84 grammes.}
 \end{array}$$

Etant données les conditions compliquées du milieu dans lequel se produit la réaction, on ne saurait prétendre à une meilleure concordance de chiffres.

EXP. 5. — Aussi était-il important de voir quelle influence avait sur la fermentation la concentration du sucre. Pour cette expérience, aussi bien que pour les suivantes, je me suis servi de la levure de Munich. Le suc contenait 16, 47 p. 100 de résidu sec et était, comme on va le voir, extrêmement actif. J'ai pris neuf fioles et ajouté, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 et 16 grammes de sucre et 20 cent. cubes de suc à chacune; j'ai ensuite mis de l'eau dans toutes les fioles à l'exception de la dernière (n<sup>o</sup> 9), pour que le volume soit toujours égal à 30 cent. cubes, 16 grammes de sucre augmentant en se dissolvant le volume de liquide à peu près de 10 cent. cubes (voir le tableau VI).

On constate, voir le tableau VI (1) : 1<sup>o</sup> que le maximum de sucre fermenté atteint est entre 28 et 35 p. 100; 2<sup>o</sup> que la quan-

(1) Pour simplifier, j'ai admis qu'un gramme d'hexose donne  $\frac{1}{2}$  gr. de CO<sub>2</sub> et  $\frac{1}{2}$  gr. d'alcool.

TABLEAU VI.

MMÈRES	CENTIMÈTRES CUBES par fiole.	GRAMMES DE CO <sub>2</sub> par jour.								GRAMMES DE SUCRE fermenté.	QUANTITÉ TOTALE de CO <sub>2</sub> .	DUREE de la fermentation.	GRAMMES DE SUCRE fermenté.	LES p. 100 de sucre fermenté.	LES p. 100 des sucres au sucre ajouté.	Peu : coagulation. Pas : peu de coagulation. Pas : pas de coagulation.	REMARQUES
		4	2	3	4	6	7	8	9								
1	20	9.40	1	3.5	0.37	0.02	0.00	...	...	...	...	2	0.39	0.78	2.6	74.2	
2	...	8.75	2	7	0.78	0.08	0.01	0.00	...	...	...	3	0.87	1.74	5.8	82.9	
3	...	7.50	4	14	1.18	0.35	0.05	0.03	0.02	0.00	...	6	1.63	3.26	10.9	77.6	
4	...	6.25	6	21	1.26	0.76	0.09	0.05	0.08	0.00	...	6	2.24	4.48	14.9	71.4	
5	...	5.00	8	28	1.21	0.90	0.34	0.12	0.05	0.00	...	6	2.62	5.24	17.5	62.4	
6	...	3.75	10	35	1.11	0.88	0.31	0.17	0.15	0.00	...	6	2.62	5.24	17.5	30.0	
7	...	2.50	12	42	1.03	0.86	0.29	0.15	0.09	0.00	...	6	2.42	4.84	16.1	88.4	
8	...	1.25	14	49	0.86	0.77	0.32	0.16	0.17	0.02	0.00	7	2.30	4.60	15.3	31.3	
9	...	0	16	56	0.43	0.80	0.45	0.32	0.27	0.07	0.02	8	2.06	4.42	13.7	24.5	

tité de sucre fermenté augmente rapidement jusqu'à la concentration optima (1) et après diminue lentement; 3° que la vitesse de réaction diminue vite avec la concentration du sucre surtout au-dessus de 50 p. 100. Cette influence retardatrice de fortes concentrations du sucre s'explique bien par ce fait que la réaction étant hétérogène, toute circonstance qui diminue le coefficient de diffusion diminue implicitement la vitesse de la réaction même. Or, Jablezynski et Jablonski (2) en se basant sur la théorie élaborée par Noyes, Whitney et Nernst, d'après laquelle la vitesse des réactions hétérogènes est réglée par la vitesse de la diffusion, ont démontré que justement les grandes concentrations de sucre (aussi bien que d'alcool) retardent de beaucoup la vitesse d'une réaction hétérogène. On voit aussi que si l'on met hors de cause l'influence d'ordre purement physique de la concentration même, on peut affirmer que la quantité de sucre décomposé ne dépend pas de sa concentration, s'il se trouve dans une quantité suffisante pour donner le maximum d'alcool et d'acide carbonique que peut produire le suc donné; autrement dit, la quantité de sucre décomposé ne dépend que de la quantité de coenzyme, si celui-là se trouve en quantité suffisante. J'ai substitué ici au mot « suc » le mot « coenzyme » en vertu des résultats des expériences précédentes qui ont démontré que la quantité de  $\text{CO}_2$  est presque proportionnelle à la quantité de suc bouilli.

Exp. 6 (A et B). — Cette expérience est analogue à la précédente, mais le suc a été dilué deux fois avec de l'eau (A) et (B) avec du suc bouilli.

On s'aperçoit (tabl. VII et VIII) que si l'on dilue deux fois, la quantité de l'acide carbonique, au delà d'une certaine concentration de sucre (qui dépend de l'activité du suc employé), n'est pas deux fois plus petite, mais un tiers seulement. Cela dépend, comme je l'ai dit ci-dessus, de causes d'ordre physique, parce que le changement de la concentration du milieu change d'une manière profonde les conditions de la coagulation des colloïdes du suc. Si le suc est trop concentré et très actif en même temps, la coagulation

(1) Il y a ici une certaine analogie avec l'action de la lipase. Voir l'intéressant travail de H. C. Bradley (*The Jour. of Biolog. Chem.*, VIII, p. 231, 1910).

(2) *Zeitsch. für physik. Chemie*, t. LXXV, p. 50, 1910.

A. — TABLEAU VII.

NIVEAUX CENT. CUBES par fiole	de suc	GRAMMES DE CO <sub>2</sub> PAR JOUR						DUREE en heures	QUANTITE CO <sub>2</sub> permise de SUCRE	CHAMPS PERMISSE le rapport du sucre ajouté	Les p. 100 du sucre fermenté ou rapport du sucre ajouté	Les p. 100 du sucre fermenté ou rapport du sucre ajouté	
		4	2	3	5	6	7						
1	10	19,40	1	3,5	0,34 coag.	0,06 coag.	0,00	»	...	...	...	2	0,40 0,80 2,7
2	»	18,73	2	7	0,54 coag.	0,20 coag.	0,04	0,02 0,00	...	...	...	5	0,80 1,60 3,3
3	»	17,50	4	14	0,56 coag.	0,59 coag.	0,24	0,18 0,02	0,00	...	...	6	1,49 2,98 9,9
4	»	16,23	6	21	0,53 coag.	0,49 coag.	0,23	0,25 0,03	0,04 0,00	...	...	7	1,58 3,46 10,5
5	»	15,00	8	28	0,48 pen	0,49 pen	0,23 pen	0,26 pen	0,06 0,03	0,01 0,00	...	8	1,58 3,46 10,5
6	»	13,75	10	35	0,44 t. peu	0,36 peu	0,38 peu	0,29 peu	0,09 0,02	0,00 0,00	...	7	1,58 3,46 10,5
7	»	12,50	12	42	0,43 pas	0,46 pas	0,26 pas	0,36 pas	0,10 0,06	0,04 0,03	0,02	10	1,76 3,52 11,7
8	»	11,25	14	49	0,44 pas	0,43 pas	0,25 pas	0,39 t. peu	0,11 0,08	0,03 0,03	0,02	10	1,73 3,46 11,5
9	»	10,00	16	56	0,46 pas	0,38 pas	0,23 pas	0,46 pas	0,07 0,07	0,08 0,08	0,02	10	1,64 3,28 10,9
													49,5

(Coag. : coagulation. — T. peu : très peu.)

B. — TABLEAU VIII.

NOMBRE	CENT. CUBES par flote	GRAMMES DE CO <sup>2</sup> PAR JOUR										REMARQUES
		1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	
1	40	19,40	1	3,5	0,37	0,04	0,00	...	...	...	...	2,3
2	"	18,75	2	7	0,84	0,05	0,04	0,00	...	...	...	72,4
3	"	17,50	4	14	1,24	0,25	0,45	0,09	0,07	0,03	...	82,9
4	"	16,25	6	21	1,23	0,40	0,30	0,19	0,08	0,04	0,03	0,87
5	"	15,00	8	28	1,21	0,43	0,31	0,21	0,18	0,08	0,04	1,74
6	"	13,75	19	35	1,40	0,56	0,29	0,21	0,17	0,10	0,05	3,8
7	"	12,50	42	42	1,03	0,46	0,34	0,20	0,17	0,09	0,03	16,1
8	"	11,25	44	49	0,78	0,43	0,34	0,25	0,17	0,10	0,05	76,8
9	"	10	46	56	0,20	0,37	0,37	0,28	0,28	0,17	0,09	17,2
												61,4
												49,5
												39,0
												34,2
												25,4

REMARQUES

Coag. : coagulation. — Tr. peu : très peu.

Les p. 100  
du sucre fermenté  
en p. 100  
du sucre fermenté  
au rapportLes p. 100  
fermenté  
fermenté  
fermenté  
fermentéGRAMMES DE SUCRE  
fermenté  
fermenté  
fermenté  
fermentéDTR.FE  
QUANTITE CO<sub>2</sub>  
GRAMMES DE SUCRE  
fermenté  
fermenté  
fermenté  
fermenté

Coag. : coagulation. — Tr. peu : très peu.

commence beaucoup plus tôt; d'autre part, comme le prouvent les expériences 5 et 6, de très fortes concentrations du sucre en retardant la marche de la fermentation retardent aussi la formation du dépôt des albuminoïdes. Si l'on fait macérer la levure qui donne un suc bien actif avec deux et demie au lieu de trois parties d'eau, on n'aperçoit pas, comme on pourrait s'y attendre, une différence correspondante dans les quantités d'acide carbonique produites; elle est toujours plus faible, comme le prouve l'expérience suivante :

Exp. 7 a. — La levure de Munich a été mise à macérer avec trois parties d'eau pendant deux heures à 35 degrés. Le suc obtenu contenait 14,78 p. 100 de résidu sec (n° 1). La même levure mise à macérer avec deux et demie parties d'eau a donné un suc contenant 16,74 p. 100 de résidu sec (n° 2).

TABLEAU IX.

NUMÉROS	CENT. CUB. de suc par fiole.	GRAMMES de sucre.	GRAMMES DE CO <sup>2</sup> PAR JOUR						DURÉE	QUANTITÉ CO <sup>2</sup> .	GRAMMES de sucre fermenté.
			1	2	3	4	5	6			
1	20	8	1.17	0.52	0.45	0.12	0.05	0.0?	6	2.33	4.66
2	"	8	1.60	0.47	0.28	0.06	0.02	0.00	5	2.43	4.86

Exp. 7 b. — Absolument les mêmes conditions, mais les deux sucs ont été deux fois dilués.

TABLEAU X.

NUMÉROS	CENT. CUBES par fiole.		SUCRE	GRAMMES DE CO <sup>3</sup> PAR JOUR								DURÉE	QUANTITÉ CO <sup>2</sup> .	GRAMMES de sucre fermenté.
	de suc.	d'eau.		1	3	4	5	6	7	8				
1	10	10	8	0.41	0.69	0.19	0.09	0.03	0.02	0.00	7	1.35	2.70	
2	"	"	8	0.57	0.76	0.16	0.08	0.04	0.02	0.00	7	1.63	3.26	

La fermentation par le suc (n° 2) va le premier jour plus vite (1,60 grammes de CO<sup>2</sup>, au lieu de 1,17 grammes), mais elle se ralentit rapidement à cause de la coagulation des albuminoïdes. Avec les sucs deux fois dilués, la fermentation est plus régulière et la différence en acide carbonique dégagé est trois fois plus grande (0,280 au lieu de 0,100 grammes CO<sup>2</sup>) (1).

(1) Il va de soi que si la dilution dépasse cette limite, l'activité du suc diminue sensiblement.

Le tableau suivant, dont les chiffres résument les expériences 5 et 6, montre d'une manière frappante que la quantité d'acide carbonique, à partir d'une certaine concentration du sucre (21 p. 100), diminue considérablement si l'on dilue le suc avec deux fois son volume d'eau; mais elle ne change pas si l'on dilue avec du suc bouilli, c'est-à-dire que le résultat final de la fermentation dépend non pas de la quantité de zymase mais de la quantité de coenzyme.

TABLEAU XI.

CONCENTRATION en hexose.	SUC non dilué.	SUC DILUÉ avec de la coenzyme.	SUC DILUÉ avec de l'eau
	Grammes de $\text{CO}_2$ .	Grammes de $\text{CO}_2$ .	Grammes de $\text{CO}_2$ .
3,5 p. 100 . . .	0.39	0.35	0.40
7 — . . .	0.87	0.87	0.80
14 — . . .	1.63	1.89	1.49
21 — . . .	2.24	2.42	1.58
28 — . . .	2.62	2.58	1.58
35 — . . .	2.62	2.60	1.58
42 — . . .	2.42	2.46	1.76
49 — . . .	2.30	2.29	1.73
56 — . . .	2.06	2.11	1.64

Enfin, pour montrer que la zymase peut faire fermenter de nouvelles quantités de sucre ajouté à la fin de la fermentation, j'ai fait l'expérience suivante qui confirme les expériences de Buchner et Klatte (1) avec le suc obtenu par broyage :

On a pris quatre fioles et ajouté à chacune 10 cent. cubes de suc de levure de Munich et 0,2 de toluène; en outre, aux fioles 1 et 3 on a ajouté 1 gramme et, aux fioles 2 et 4, 2 grammes de saccharose. Après deux jours, la fermentation finie, on a ajouté, aux fioles 1 et 2, 10 cent. cubes du même suc bouilli; aux fioles 3 et 4, 10 cent. cubes d'eau. En outre, aux fioles 1 et 3, on a ajouté 1,8 gramme et, à celles 2 et 4, 3 gr. 3 de saccharose pour compenser la perte en sucre subie pendant la fermentation. Dans toutes les fioles on a mis de nouveau du toluène. Le suc pour cette expérience a été obtenu de la levure de Schroder, macérée pendant deux heures à 35 degrés avec trois parties d'eau.

On a constaté que la quantité d'acide carbonique produite après l'addition du suc bouilli et du sucre a doublé (au lieu de

(1) *Loc. cit.*

0,36 et 0,61 gramme, 0,67 et 1,38 gramme); seulement la fermentation s'était ralentie (au lieu d'un jour, trois à quatre jours), ce qui se comprend d'ailleurs bien aisément si l'on envisage que la concentration de la zymase est devenue deux fois plus faible et que, d'autre part, son activité était considérablement affaiblie par la coagulation partielle du suc après le premier jour de fermentation. Ce dernier phénomène se produit toujours quand la concentration du sucre est faible comparativement à son activité, surtout avec le suc de levure de Munich.

TABLEAU XII.

NU MÉROS	CENT. CUPES DE SUC par rôle.	GRAMMES DE SUCRE	GRAMMES DE CO <sub>2</sub> PAR JOUR							QUANTITÉ DE CO <sub>2</sub> après addition du sucre et du sucre.	DURÉE de la fermentation avant addition.	DURÉE de la fermentation après addition.	
			4	2	sucre gr.	3	5	6	7				
1	10	1	0.36	0.00		1.8	0.59	0.43	0.00	"	0.67	1	3
2	"	2	0.61	0.00	Addition du suc bouilli (ou de l'eau) et du sucre.	3.3	0.52	0.65	0.21	0.00	1.38	1	4
3	"	1	0.38	0.00		1.8	0.03	0.02	0.00	"	0.03	1	3
4	"	2	0.69	0.00		3.3	0.05	0.02	0.00	"	0.07	1	3

Je décrirai dans le mémoire suivant les expériences qui font très probable l'existence de la présure (lab-ferment) dans le suc de levure.

De tout l'ensemble des faits relatés ici, se dégagent clairement les déductions principales suivantes :

1<sup>o</sup> La zymase du suc de macération est une diastase typique;  
2<sup>o</sup> La quantité de sucre fermenté est à peu près proportionnelle à la quantité de coenzyme, si celui-là se trouve dans une concentration convenable, c'est-à-dire d'au moins 20 p. 100 (pour les sucs très actifs);

3<sup>o</sup> L'activité énorme du suc extrait d'après ma méthode est due à sa richesse en coenzyme. Ce fait donne droit de penser que l'activité de la levure dépassant toujours de beaucoup celle du suc ne dépend pas de ce qu'elle contient plus de zymase, mais qu'au fur et à mesure que la coenzyme sous forme organique est détruite pendant la fermentation, de nouvelles quantités en sont formées par le pouvoir synthétique de la cellule.

## ÉTUDE DE L'INULASE D'ASPERGILLUS NIGER

par J. BOSELLI.

(Travail du laboratoire de M. Fernbach, à l'Institut Pasteur.)

L'inulase a été découverte par Green (*Annals of Botany*, 1, 1888) et extraite par ce savant de plusieurs plantes de la famille des Composées dans lesquelles l'hydrate de carbone de réserve est l'inuline. Comme source d'inulase, on a aussi utilisé des moisissures, *penicillium* et *aspergillus niger*. Bourquelot (*Journ. d'anat. et de phys.*, 1886, p. 493; et C. R., cxvi-4143), en ensemencant *aspergillus niger* dans un liquide Raulin contenant de l'inuline comme hydrate de carbone, a observé la production d'inulase par le végétal. Cet auteur a vérifié en outre que l'inuline, après hydrolyse par l'inulase d'aspergillus, fermentait par la levure, tandis que l'inuline non hydrolysée par le ferment de la moisissure ne fermentait pas.

Nous avons étudié certaines propriétés et conditions de sécrétion de l'inulase d'*aspergillus niger*. Nos recherches ont porté sur les points suivants :

- 1<sup>o</sup> Loi d'action de l'inulase;
- 2<sup>o</sup> Optimum d'acidité et de température;
- 3<sup>o</sup> Conditions de sécrétion; dosage du ferment dans le végétal; influence sur la sécrétion de l'aliment hydrocarboné et de l'aliment azoté.

Avant de donner nos résultats, nous indiquerons notre méthode expérimentale.

L'*aspergillus* a été cultivé sur liquide Raulin ordinaire, dans lequel l'hydrate de carbone était l'inuline; cependant, dans nos expériences relatives à l'influence de l'aliment hydrocarboné et azoté, nous avons employé le saccharose, le glucose, le lévulose et le sucre de lait.

Le ferment était extrait de la façon suivante : supposons que 100 centimètres cubes de liquide Raulin aient été ensemencés; lorsqu'on a retiré la culture (qui a lieu à 37 degrés) une partie du liquide nutritif s'est évaporé; on recueille le liquide restant, on lave avec un peu d'eau distillée la face

inférieure du mycélium, on ajoute au liquide restant l'eau de lavage et complète à 100 centimètres cubes.

Le mycélium est broyé avec du sable et un peu d'eau sur plan de verre dépoli et à la molette suivant une méthode employée par M. Fernbach (Thèse de doctorat, 1890) pour l'étude de la sucrase; on laisse digérer la pâte obtenue pendant douze heures avec 50 centimètres cubes d'eau distillée; on essore et lave à la trompe; on ajoute au filtrat les eaux de lavage et complète à 100 centimètres cubes. Nous avons vérifié à plusieurs reprises que le résidu ainsi épuisé était complètement inactif.

Dans nos premiers essais, nous nous sommes servis d'inuline de chez Poulenc; ensuite nous avons employé une inuline préparée au laboratoire par une méthode indiquée par M. Wolff; elle consiste à extraire à la presse le jus de racines de chicorée améliorée; on fait bouillir ce jus, ce qui coagule des albuminoïdes et d'autres substances, et on filtre à chaud; le filtrat refroidi laisse déposer après vingt-quatre heures une certaine quantité d'inuline qu'on recueille et essore à la trompe; l'inuline dissoute dans le liquide surnageant est obtenue par congélation. On purifie par plusieurs dissolutions successives dans l'eau chaude.

#### LOI D'ACTION DU FERMENT.

Avant d'étudier l'activité du ferment dans différentes conditions, il y a lieu de définir cette activité.

Pour éliminer la complication provenant de concentrations initiales différentes d'inuline, nous nous sommes astreints, dans toutes nos mesures d'activité sans exception, à avoir toujours la même concentration initiale d'inuline. Les solutions dans lesquelles agissait le ferment étaient telles qu'en supposant l'inuline entièrement hydrolysée, la concentration du lévulose fût de 2 p. 100. Dans ces conditions, nous avons observé que la loi d'action du ferment est à peu près logarithmique, c'est-à-dire que l'on a sensiblement la relation :

$$(1) \quad \frac{dx}{dt} = Kc(2-x).$$

*x* concentration au temps *t* du lévulose formé, exprimée en grammes par 100 centimètres cubes;

*c* concentration du ferment exprimée par le nombre de centimètres cubes de la solution diastasique (liquide de culture

d'aspergillus ou liquide de broyage des cellules) contenus dans 100 centimètres cubes de la solution diastase + inuline.

La relation (1) fournit l'expression :

$$(2) \quad K = \frac{1}{tc} \times \ln \frac{2}{2-x}.$$

Pour la commodité des calculs, nous avons pris comme mesure de l'activité du ferment la constante  $K_1$ , proportionnelle à  $K$  et donnée par la relation

$$(3) \quad K_1 = \frac{1}{tc} \log_{10} \frac{2}{2-x},$$

le temps  $t$  étant exprimé en minutes.

$K_1$  peut être considéré comme mesurant l'activité du ferment, à condition de faire agir ce ferment dans les solutions dont la concentration initiale en inuline est telle que cette inuline totalement hydrolysée donne une solution à 2 p. 100 de lévulose.

Voici les résultats d'une expérience faite à 51 degrés, montrant les variations de  $K_1$  à mesure que l'hydrolyse s'effectue :

$$c = 50 \text{ acidité en } \text{SO}^4\text{H}^2 = \frac{0,5}{100} \text{ normale.}$$

Valeurs de :	$x$	$t$	$K_1$
	—	—	—
0,51	420	$2,15 \times 10^{-3}$	
0,90	240	2,18	
1,20	360	2,23	
1,45	480	2,33	

L'expérience résumée dans le tableau précédent a été faite de la façon suivante : on a ajouté à 50 centimètres cubes de liquide de broyage du mycélium d'une culture d'aspergillus sur inuline un volume convenable d'une solution d'inuline préalablement titrée et une certaine quantité de  $\text{SO}^4\text{H}^2$  titré; puis, la solution a été complétée à 100 centimètres cubes; la quantité d'inuline était telle qu'en supposant l'hydrolyse totale la solution contienne 2 grammes de lévulose; le liquide de broyage était préalablement neutralisé par rapport à l'hélianthine, et la concentration de la solution inuline + inulase en  $\text{SO}^4\text{H}^2$  était  $\frac{1}{200}$  normale.

Comme l'acide seul hydrolyse à 51 degrés l'inuline d'une façon notable, un témoin était fait de la façon suivante : Dans

le thermostat à eau contenant le mélange A inuliné + inulase étaient placés 100 centimètres cubes d'un mélange B inuline + inulase bouillie contenant 50 centimètres cubes de liquide de broyage bouilli et la même quantité d'inuline et d'inulase que A; A et B ayant été placés simultanément, des prélèvements simultanés furent effectués après 2, 4, 6 et 8 heures; après chaque prélèvement, on arrêtait l'hydrolyse en ajoutant un léger excès de soude (procédé que nous justifierons ultérieurement), et l'on faisait des dosages au Fehling.

Les valeurs de  $x$  du tableau sont donc les différences entre les poids de lévulose formés en A et B.

D'autres expériences faites dans d'autres conditions de température, d'acidité et de concentration du ferment nous ont montré que la loi logarithmique est dans tous les cas approximativement vérifiée, à condition, bien entendu, d'hydrolyser des solutions d'inuline à 2 p. 100.

#### OPTIMUM D'ACIDITÉ ET DE TEMPÉRATURE.

Les études de ces deux optimums doivent être faites simultanément, étant donné que l'optimum d'acidité varie beaucoup avec la température.

Pour le montrer, nous donnerons une série de résultats d'expériences faites à 17, 35, 42, 51, 55 et 59 degrés.

Nous opérions en laissant un certain temps des solutions inuline + inulase dans un thermostat à eau; la liqueur diastasique employée était le liquide de broyage d'une culture sur inuline, ramené à la neutralité à l'hélianthine lorsqu'il était nécessaire; les hydrolyses s'effectuaient dans une série de tubes à essai; les concentrations de la diastase et de l'inuline étaient les mêmes dans tous ces tubes, mais celles en acide différentes. En outre, à chaque essai correspondait un témoin contenant de l'acide à la même concentration et du liquide diastasique bouilli. Les acides étudiés par nous sont les acides sulfurique et acétique.

Les tableaux suivants résument une série de résultats; sous la lettre A sont les valeurs de l'acidité *en centièmes de la normalité*; en regard sont les valeurs de K<sub>1</sub> correspondantes.

## Température : 17 degrés.

ACIDE SULFURIQUE		ACIDE ACÉTIQUE	
A	K <sub>1</sub>	A	K <sub>1</sub>
0	$0,3 \times 10^{-3}$	0	$0,43 \times 10^{-3}$
0,4	0,65	4	1,4
0,8	1,46	8	4,33
1,2	1,24	12	1,48
1,6	1,11	16	1,48
3	0,7	30	4,37
8	0,23	80	0,62

## Température : 35 degrés.

ACIDE SULFURIQUE		ACIDE ACÉTIQUE	
A	K <sub>1</sub>	A	K <sub>1</sub>
0	$0,4 \times 10^{-3}$	0	$0,52 \times 10^{-3}$
0,4	1,2	4	4,31
0,8	1,43	8	4,60
1,2	1,43	12	1,60
1,6	1,23	16	1,62
3	0,71	30	4,26
6	Très petit.	60	0,31

## Température : 51 degrés.

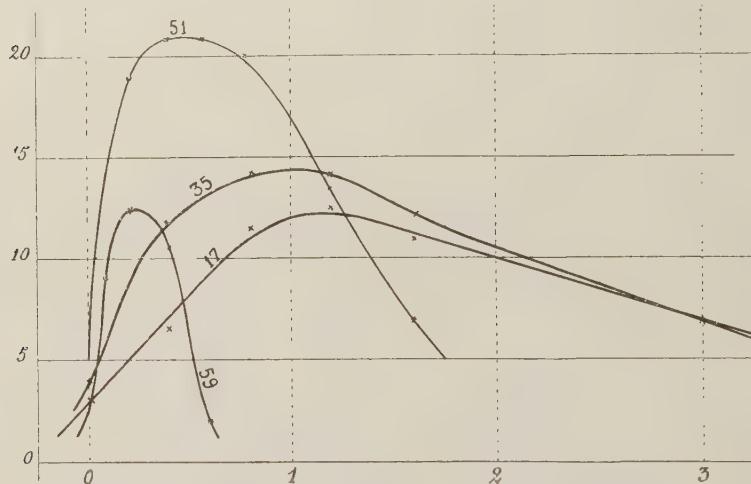
ACIDE SULFURIQUE		ACIDE ACÉTIQUE	
A	K <sub>1</sub>	A	K <sub>1</sub>
0	$0,6 \times 10^{-3}$	0	$0,73 \times 10^{-3}$
0,2	1,9	2	1,41
0,4	2,09	4	1,89
0,6	2,09	6	2,16
0,8	2,01	8	2,30
1,2	1,36	12	2,44
1,6	0,7	16	1,69
3,2	Très petit.	32	0,32

## Température : 59 degrés.

ACIDE SULFURIQUE		ACIDE ACÉTIQUE	
A	K <sub>1</sub>	A	K <sub>1</sub>
0	$0,3 \times 10^{-3}$	0	$0,39 \times 10^{-3}$
0,1	0,9	1	4,23
0,2	4,25	2	4,40
0,4	4,05	4	4,42
0,6	0,2	6	1,21
1	Très petit.	10	0,34

Les résultats des expériences faites avec  $\text{SO}_4^{\text{II}}\text{H}^{\text{I}}$  sont mis

aussi sous forme graphique (fig. I); en abscisses sont les concentrations de l'acide *en centièmes de normalité*; en ordonnées, les valeurs de  $K_1 \times 10^4$ ; chaque courbe correspond à une série d'expériences faites à une température déterminée; cette température est indiquée par un chiffre placé le long de la courbe.



A toute température, une très faible alcalinité suffit à empêcher entièrement l'hydrolyse; il suffit que la concentration de la soude soit 0,002 normale pour qu'on ne remarque aucune différence avec le témoin.

On voit que l'optimum d'acidité correspond à une acidité de plus en plus faible à mesure que la température s'élève. Des résultats précédents, et d'autres analogues, on peut déduire les valeurs approximatives de concentrations optimas en acides sulfurique et acétique, à diverses températures.

VALEURS de température.	CONSENTRATION optimale en $\text{SO}_4^{2-}$ (N/100)	VALEURS de $K_1$ corresp.	CONSENTRATION optimale en $\text{CH}_3\text{COO}^-$ (N/100)	VALEURS de $K_1$ corresp.
17	1,3	1,24 $\times 10^{-3}$	14	1,48 $\times 10^{-3}$
35	0,9	1,43	12	1,60
42	0,7	1,8	"	"
51	0,5	2,09	8	2,30
55	0,35	1,97	"	"
59	0,2	1,25	3	1,44

Lorsqu'on emploie un acide déterminé, il existe donc une température et une concentration optimas ; cette température paraît voisine de 51 degrés, que l'on emploie l'acide sulfurique ou l'acide acétique ; la concentration optima en  $\text{SO}_4^{\text{2-}}\text{H}^{\text{+}}$  est  $\frac{1}{200}$  normale environ et en  $\text{C}_2\text{O}_4^{\text{2-}}\text{H}^{\text{+}}$   $\frac{1}{42,5}$  normale. Il y a d'ailleurs lieu de remarquer que les valeurs de  $K_1$ , correspondant à des concentrations optimas en  $\text{SO}_4^{\text{2-}}$  et  $\text{C}_2\text{O}_4^{\text{2-}}$  peuvent être considérées comme à peu près identiques à une même température. Peut-être est-il permis de faire l'hypothèse que seuls les ions  $\text{H}^{\text{+}}$  ont une action sur l'activité du ferment et que l'anion ou la partie non dissociée de l'acide ne jouerait qu'un faible rôle.

Dans toutes les expériences suivantes, l'activité a été mesurée à 51 degrés ; l'acide employé était  $\text{SO}_4^{\text{2-}}\text{H}^{\text{+}}$   $\frac{1}{200}$  normal.

Comme action de température, on peut étudier aussi la résistance à la chaleur ; c'est ce que nous avons fait. Une solution diastasique était placée dans un thermostat chauffé graduellement à raison d'une élévation de 1 degré par minute environ. Un thermomètre était placé dans la solution ; on faisait des prélèvements à diverses températures, refroidissait rapidement et mesurait l'activité ; les résultats sont les suivants :

TEMPÉRATURE DE CHAUFFAGE	VALEUR DE $K_1$
Ferment non chauffé . . . . .	$2,32 \times 10^{-3}$
Ferment chauffé à 60 degrés.	2,36
— à 63 degrés.	2,12
— à 66 degrés.	1,7
— à 70 degrés.	1,2
— à 73 degrés.	0,5
— à 76 degrés.	0

On voit que la diastase chauffée à 63 n'est pas détruite, fait déjà observé par Bourquelot ; mais à 70 son activité est déjà diminuée de moitié ; à 76 degrés la destruction est complète.

## CONDITIONS DE SÉCRÉTION DU FERMENT.

Nous avons étudié d'abord la sécrétion du ferment d'après l'âge de la culture. Une série de fioles d'Erlenmeyer semblables contenant chacune 2 grammes d'inuline pour 50 centimètres cubes de liquide Raulin étaient mises simultanément à l'étuve 37 degrés, et ensemencées au moyen de volumes égaux d'eau distillée tenant en suspension des spores provenant d'une culture précédente. Après des intervalles de 2, 3, 4, 5 et 7 jours on prélevait simultanément deux échantillons. L'un servait à la pesée du végétal produit, l'autre au dosage du ferment ; à cet effet, le liquide de culture était recueilli et complété à 50 centimètres cubes avec les eaux de lavage de la face inférieure du mycélium ; celui-ci était broyé à la molette et épuisé par l'eau comme nous l'avons déjà indiqué ; ce liquide de broyage était complété à 50 centimètres cubes. L'activité des deux liquides était mesurée par la valeur de K, correspondant à 51 degrés en présence de  $\text{SO}_4\text{H}_2$   $\frac{N}{200}$ .

Voici les résultats d'une série d'expériences :

NOMBRE DE JOURS depuis l'ensemencement.	ACTIVITÉ du liquide de culture.	ACTIVITÉ du liquide de broyage,	ACTIVITÉ totale.	POIDS de plante en grammes.
2	$0,43 \times 10^{-3}$	$2,23 \times 10^{-3}$	$2,66 \times 10^{-3}$	0,403
3	0,75	2,15	2,9	0,681
4	1,23	2,03	3,26	0,683
5	1,31	1,82	3,13	0,679
7	1,92	1,11	3,03	0,593

Ces expériences sont à rapprocher de celles de M. Fernbach sur la sucrase. On observe de même qu'une quantité croissante de ferment diffuse dans le liquide de culture à mesure que celle-ci vieillit, phénomène qui peut être attribué à une augmentation de perméabilité des membranes cellulaires ; mais il y a lieu de remarquer que l'inulase paraît diffuser relativement plus facilement que la sucrase.

## INFLUENCE DE L'ALIMENT HYDROCARBONÉ ET AZOTÉ.

Les hydrates de carbone étudiés par nous sont l'inuline, le glucose, le lévulose (inuline hydrolysée), le saccharose et le

sucre de lait. Une série de fioles d'Erlenmeyer contenant chacune 2 grammes d'hydrate de carbone dans 50 centimètres cubes de Raulin étaient mises à l'étuve et recueillies après trois jours. On dosait l'inulase dans le mycélium et le liquide de culture ; un témoin donnait le poids de végétal.

Voici les résultats obtenus :

CULTURE sur :	INULASE des cellules.	INULASE du liquide.	TOTAL	POIDS de plante.
Inuline . . . .	$2,31 \times 10^{-3}$	$0,83 \times 10^{-3}$	$3,13 \times 10^{-3}$	0,689
Saccharose . . .	2,11	0,91	3,07	0,767
Glucose . . . .	2,23	0,73	2,96	0,742
Lévulose . . . .	2,07	0,95	3,02	0,673
Sucre de lait. . .	»	«	»	La culture ne pousse pas.

On voit que les 4 cultures qui ont poussé présentent bien peu de différences ; pensant que l'hérédité pourrait modifier le pouvoir sécréteur de l'*aspergillus*, nous avons fait deux séries parallèles de 5 cultures successives sur inuline et saccharose, chaque culture d'inuline étant ensemencée avec les spores de la culture précédente sur inuline et chaque culture sur saccharose avec les spores de celle précédente sur saccharose. Nous n'avons vu aucune différence notable entre la 1<sup>re</sup> et la 5<sup>e</sup> culture sur inuline, entre la 1<sup>re</sup> et la 5<sup>e</sup> culture sur saccharose, où entre les 5<sup>e</sup> cultures sur inuline et saccharose.

Nous avons pensé que peut-être, en modifiant la nature de l'aliment azoté, nous exalterions la sécrétion d'inulase. Aussi, avons-nous fait deux cultures comparatives, l'une contenant 2 grammes de saccharose dans 50 centimètres cubes de liquide Raulin, et l'autre 2 grammes de saccharose + 1 gramme de peptone Chapoteau.

Cette dernière culture pousse bien plus rapidement que sur saccharose seul, mais la sécrétion d'inulase n'est nullement accrue ; on peut même dire qu'elle est relativement plus faible puisque le poids de végétal est plus grand.

Voici les résultats obtenus :

CULTURE sur	INULASE du liquide.	INULASE des cellules.	TOTAL	POIDS de plante.
Saccharose . . . . .	$0,98 \times 10^{-3}$	$2,29 \times 10^{-3}$	$3,27 \times 10^{-3}$	0,751
Saccharose + peptone .	$0,79 \times 10^{-3}$	2,36	3,15	1,03

## CONCLUSIONS.

1<sup>o</sup> La sécrétion de l'inulase par *l'aspergillus niger* paraît remarquablement constante ; elle ne semble pas notablement modifiée, que l'on fasse, toutes choses égales, des cultures sur inuline, lévulose, saccharose, glucose ou saccharose + peptone, à condition d'employer un poids d'hydrate de carbone déterminé ;

2<sup>o</sup> Cette inulase diffuse assez facilement dans le liquide de culture *d'aspergillus* et d'autant plus que la culture est moins jeune ;

3<sup>o</sup> La loi d'action du ferment, en supposant la concentration initiale d'inuline invariable, est sensiblement logarithmique ;

4<sup>o</sup> L'optimum d'acidité varie avec la température et correspond à une acidité d'autant plus faible que la température est plus élevée. Lorsqu'on emploie un acide déterminé, il y a une température et une concentration en acide optimas ; cette température paraît voisine de 51 degrés, que l'on emploie l'acide sulfurique ou l'acide acétique ; la concentration optima en  $\text{SO}_4\text{H}_2$  à cette température est  $\frac{1}{200}$  normale environ et en

$\text{C}_2\text{O}_2\text{H}_4$   $\frac{1}{12,5}$  normal ;

5<sup>o</sup> A toute température, une alcalinité très faible arrête l'action du ferment ;

6<sup>o</sup> A une même température, les activités du ferment correspondant à des concentrations optima en  $\text{SO}_4\text{H}_2$  et  $\text{C}_2\text{O}_2\text{H}_4$  sont à peu près identiques.

---

Dans le numéro de ces *Annales* de juillet dernier, une omission s'est produite. La table chauffante de M. Gatin est construite par la maison Stiassnie, 204, boulevard Raspail, à Paris.

---

*Le Gérant : G. MASSON.*

---

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.



